ORSAY
Série A
N° d'Ordre
154

THÈSE

DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

présentée

A L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

par

Michelyne BRETON-BITRAN

Sujet de la Thèse :

ACTIVITÉ PHOSPHOLIPASIQUE DES GLOBULES ROUGES HUMAINS.

Soutenue le 26-6 - 1973, devant la Commission d'Examen :

M.M. E. LEDERER *Président*
H. CLAUSER *Rapporteur*
J. POLONOVSKI *Examinateur*

ORSAY
Série A
N° d'Ordre

THÈSE

DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

présentée

A L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD
CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR D'UNIVERSITÉ

par

Michelyne BRETON-BITRAN

Sujet de la Thèse :

ACTIVITÉ PHOSPHOLIPASIQUE DES GLOBULES ROUGES HUMAINS.

Soutenue le **1973, devant la Commission d'Examen :**

M.M. E. LEDERER *Président*
H. CLAUSER *Rapporteur*
J. POLONOVSKI *Examinateur*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A la mémoire de Madame PAYSANT

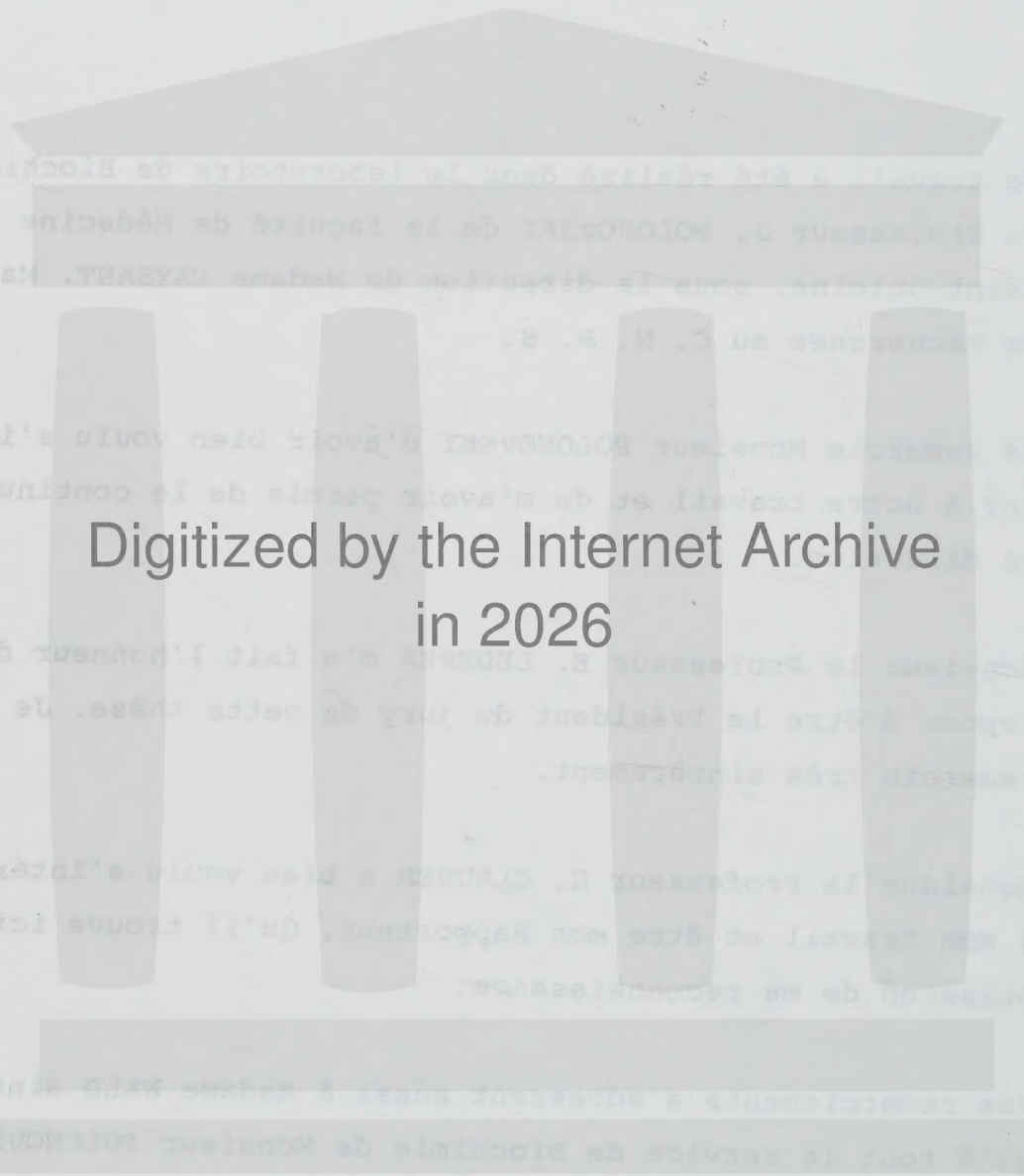
Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de Biochimie du Professeur J. POLONOVSKI de la faculté de Médecine Saint-Antoine, sous la direction de Madame PAYSANT, Maître de Recherches au C. N. R. S.

Je remercie Monsieur POLONOVSKI d'avoir bien voulu s'intéresser à notre travail et de m'avoir permis de le continuer sous sa direction.

Monsieur le Professeur E. LEDERER m'a fait l'honneur d'accepter d'être le Président du jury de cette thèse. Je l'en remercie très sincèrement.

Monsieur le Professeur H. CLAUSER a bien voulu s'intéresser à mon travail et être mon Rapporteur. Qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Mes remerciements s'adressent aussi à Madame WALD ainsi qu'à tout le service de Biochimie de Monsieur POLONOVSKI.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543920_0029

- P L A N -

Activité phospholipasique des globules rouges humains

INTRODUCTION

TECHNIQUES GENERALES

I. - PREPARATIONS DES SUBSTRATS RADIOACTIFS

A. Préparation des différentes cultures microbiennes marquées au phosphate ^{32}P

B. Isolement des différents phospholipides

II. - PRELEVEMENT DE SANG ET PREPARATION DE L'EXTRAIT ENZYMATIQUE

III. - TECHNIQUE D'INCUBATION ET MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

RESULTATS

I. - MISE EN EVIDENCE D'UNE PROPHOSPHOLIPASE DANS LES GLOBULES ROUGES HUMAINS

A. Différence de comportement avec les globules rouges de rat

B. Conditions de l'activation

II. - ETUDE CINETIQUE DE LA PHOSPHOLIPASE OBTENUE PAR ACTIVATION DE LA PROPHOSPHOLIPASE

III. - COMPARAISON DES DEUX ACTIVATEURS LIBERANT LA PROPHOSPHOLIPASE EN PHOSPHOLIPASE

A. Activateur trypsique

B. Activateur plaquettaire

IV. - LOCALISATION DE LA PROPHOSPHOLIPASE

A. Préparation d'un lysat de globules rouges humains

B. Préparation des membranes dépourvues d'hémoglobine

.../..

V. - TENTATIVE D'ISOLEMENT DE LA PROPHOSPHOLIPASE

A. Précipitation éthanolique et filtration sur Séphadex

B. Relargage par le sulfate d'ammonium et filtration sur Séphadex

C. Précipitation à pH acide par la chaleur

VI. - ESSAI DE PURIFICATION DE LA PHOSPHOLIPASE LIBEREE

DISCUSSION ET CONCLUSION

RESUME

BIBLIOGRAPHIE

I N T R O D U C T I O N

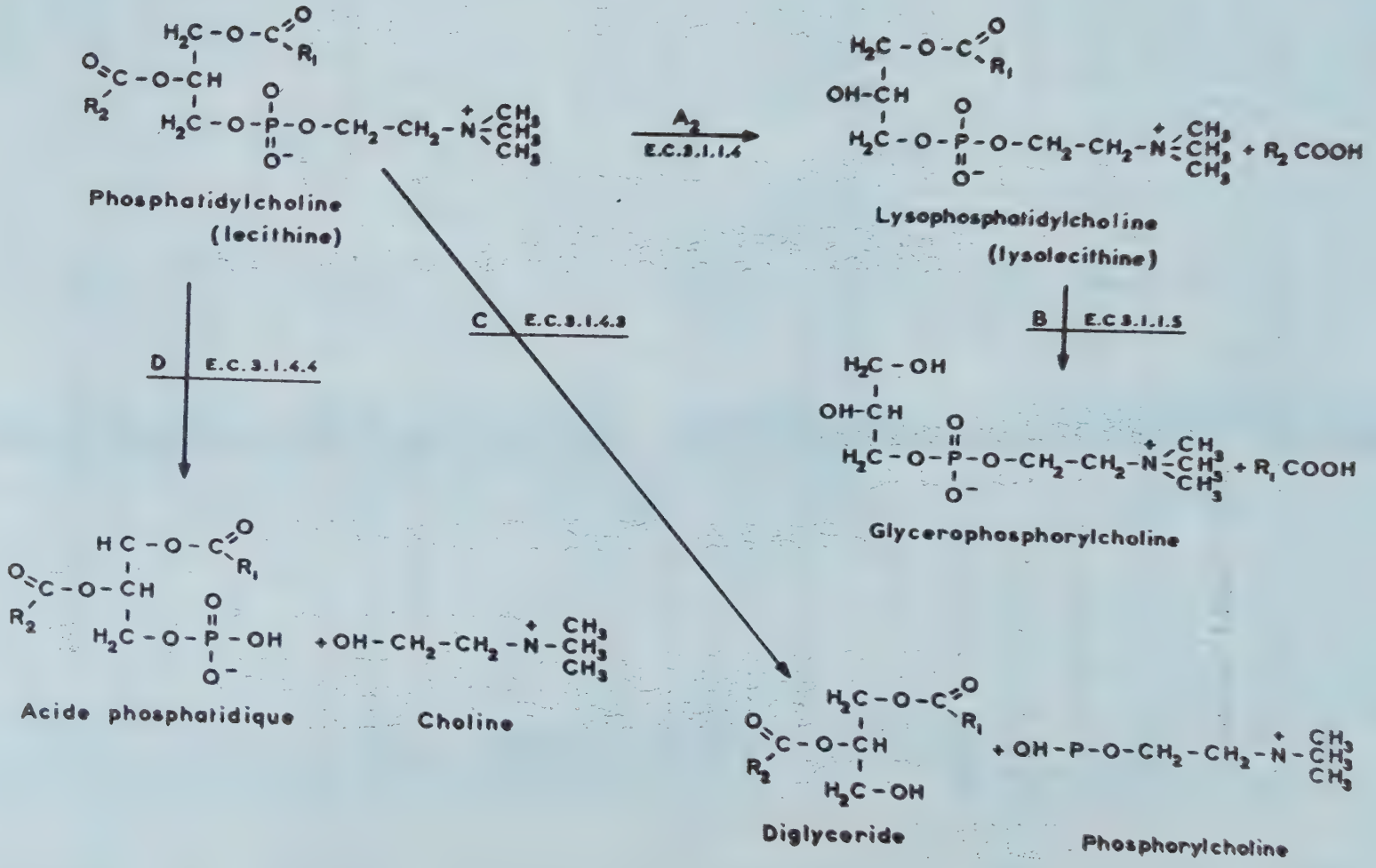
Le catabolisme des glycérophosphatides est assuré dans l'organisme par un groupe d'hydrolases qui procèdent à leur dégradation enzymatique. Ces hydrolases ont reçu plusieurs appellations successives : "lécithinases", "phosphatidases", "phospholipases". Le terme officiel est phosphatidyl-acyl-hydrolases.
Dans le langage courant elles sont appelées phospholipases et sont classées dans le groupe 3 par la Commission des Enzymes de la Société Internationale de Biochimie.

Tableau I

Classification des phospholipases.

Numérotation	Nom officiel	Nom courant
E.C.3.I.I.4.	Phosphatidyl acyl hydrolase	Phospholipase A
E.C.3.I.I.5.	Lysolécithine acyl hydrolase	Phospholipase B ou lysophospholipase
E.C.3.I.4.3.	Phosphatidylcholine-choline phosphohydrolase	Phospholipase C
E.C.3.I.4.4.	Phosphatidylcholine choline phosphatide hydrolase	Phospholipase D

SPECIFICITE D'ACTION DES PHOSPHOLIPASES SUR LA LECITHINE



La phospholipase A_2 agit spécifiquement sur les L- -phosphoglycérides ; elle hydrolyse la liaison ester d'acide gras estérifiant la fonction alcool secondaire du glycérol que l'acide gras soit saturé ou insaturé (I-2).

De la même façon la phospholipase A_I agit spécifiquement sur la liaison ester d'acide gras sur le premier carbone des L- -phosphoglycérides.

La phospholipase B ou lysophospholipase détache l'acide gras estérifié sur le premier atome de carbone des lysodérivés obtenus par action de la phospholipase A_2 pour donner la glycérophosphorylcholine à partir de la phosphatidylcholine.

La phospholipase C agit sur la molécule de phosphatidylcholine pour donner naissance à un diglycéride et à la phosphorylcholine.

La phospholipase D hydrolyse la molécule de phosphatidylcholine en libérant la choline et un acide phosphatidique. (Tableau 2).

Les phospholipases A_2 sont largement répandues dans le règne animal, les venins de serpents et d'abeilles en constituent les sources les plus importantes et les plus anciennement connues. Plus récemment les phospholipases A_2 ont été étudiées dans les différents organes de mammifères tels que pancréas, reins, foie et cerveau (3-4-5-6). Dans la muqueuse intestinale (7) et dans les homogénats d'aorte humaine et de rat (8), la phospholipase A_2 semble associée à une lysophospholipase, alors que les homogénats de cerveau de rat contiennent à la fois les activités phospholipasiques A_I et A_2 (9). Une phospholipase A_2 existe sous forme inactive dans le pancréas de porc (IO-II), d'homme et de rat (I2). Le zymogène est transformé in vitro en phospholipase active par action de la trypsine.

Récemment de nombreux essais de purification de phospholipase A ont été tentés avec succès à partir de venins (I3-I4-I5) de cerveau de rat (3) et de foie de rat (I6).

DE HASS et coll. (I7-I8) ont établi la structure primaire de la phospholipase A_2 de pancréas de porc et de son précurseur. Elle est constituée d'une chaîne polypeptidique comprenant I23 acides aminés et 6 ponts disulfures.

Les membranes des bactéries sont également très riches en phospholipides et des activités phospholipasiques A, B et C ont été mises en évidence dans certaines souches d'E. coli(I9-20-2I).

Dans le laboratoire de Madame PAYSANT, une phospholipase A_2 a été mise en évidence dans les globules rouges de rat (22-23-24), ainsi que son précurseur.

Notre travail a pour objet l'étude d'une phospholipase A_2 se trouvant à l'état inactif dans les globules rouges humains et pouvant être activée en phospholipase active par addition d'un facteur plaquettaire isolé de sang de rat ou d'un facteur contenu dans un extrait brut de trypsine bovine (produit Sigma).

Nous étudions la transformation de la prophospholipase en phospholipase par ces deux facteurs et la cinétique de cette prophospholipase activée.

Finalement nous avons voulu essayer d'isoler cette prophospholipase à partir de globules rouges humains puis dans un deuxième temps, purifier la phospholipase une fois libérée par un des deux facteurs activateurs.

TECHNIQUES GENERALES

I - PREPARATIONS DES SUBSTRATS RADIOACTIFS

A. PREPARATION DES DIFFERENTES CULTURES MICROBIENNES MARQUEES AU PHOSPHATE ^{32}P

1. Culture de Staphylococcus aureus

Elle permet la préparation du phosphatidylglycérol (PG). Le phosphatidylglycérol est extrait des phospholipides d'une souche de Staphylococcus aureus. Les Staphylocoques sont ensemencés dans un bouillon nutritif et incubés pendant une nuit à 37°. Cette suspension est répartie dans 24 boîtes de Pétri à raison de 0,5 ml par boîte. Chacune d'elle a reçu préalablement 20 ml de gélose additionnée de I,5 mCi de phosphate radioactif. L'incubation est effectuée à 37° pendant 6 heures. La culture microbienne est mise en suspension par grattage de la gélose en présence de tampon Na_2HPO_4-KH_2PO_4 0,2 M à pH 7. Le tampon phosphate contenant la suspension bactérienne est centrifugé, le surnageant est écarté et le culot lavé par le même tampon phosphate à la concentration de 0,02 M. Après une nouvelle centrifugation, le culot est formé de toutes les bactéries et débarrassé du phosphate radioactif qui n'a pas été incorporé.

2. Culture d'Echerichia coli

Elle permet la préparation de phosphatidyléthanolamine (PE).

Une souche d'E.coli K_{I2} 3000 est ensemencée en milieu tryptose Ts renfermant 2 mCi de phosphate ^{32}P pour IO ml. La croissance des bactéries dure 4 h 30 à 37° sous agitation. Les cellules sont recueillies après centrifugation et lavées par du tampon Na_2HPO_4-KH_2PO_4

.../..

0,2 M à pH 7. Après une nouvelle centrifugation le surnageant est éliminé et le culot lavé une deuxième fois par le même tampon phosphate à la concentration de 0,02 M.

3. Culture d'Agrobactérium tuméfaciens

Elle permet la préparation de phosphatidylcholine (PC). Vingt portions de 0,5 ml de suspension bactérienne sont ensemencées chacune avec 20 ml de gélose nutritive additionnée de 1 mCi de phosphate radioactif. La croissance des bactéries en présence du phosphate radioactif est effectuée à 30° C pendant 46heures. La culture microbienne est mise en suspension par grattage de la gélose en présence de tampon Na_2HPO_4-KH_2PO_4 0,2 M pH 7. Les bactéries sont ensuite lavées par le même tampon de concentration 0,02 M.

B. ISOLEMENT DES DIFFERENTS PHOSPHOLIPIDES

La purification de chaque phospholipide suit les mêmes méthodes d'extraction.

A partir des culots des différentes bactéries l'extraction lipidique est faite par du chloroforme-méthanol 1/2 (v/v). L'extrait lipidique est purifié suivant la technique de Folch-Pi (25), de façon à écarter des phospholipides les substances hydrosolubles marquées.

Cet extrait de phospholipides purifié est fractionné sur colonne d'acide silicique par des mélanges chloroforme-méthanol enrichis progressivement en méthanol :

- phosphatidylglycerol est élué par le mélange chloro-

- la phosphatidyléthanolamine est éluée par le mélange chloroforme-méthanol 7/1 (v/v).

- la phosphatidylcholine est éluée par le mélange chloroforme-méthanol 1/1 (v/v).

Leur pureté est vérifiée par chromatographie sur couche mince de gel de silice G dans les phases : neutre (chloroforme-méthanol-eau : 65-25-4 v/v/v.) et acide (chloroforme-méthanol-acide acétique-eau : 65-25-8-4 v/v/v/v.), (26) et autoradiographie.

Les comptages de radioactivité et les dosages de phosphore de chacun des phospholipides purifiés (effectués après minéralisation sulfurique-eau oxygénée selon la méthode de Fiske modifiée par Delsal (27), permettent de déterminer l'activité spécifique des phospholipides ainsi préparés. Elle est comprise entre I50 000 et 200 000 c/min/µg de phosphore pour le phosphatidylglycérol et la phosphatidylcholine. L'activité spécifique de la phosphatidyléthanolamine est de 500 000 c/min/µg de phosphore mais cette préparation marquée est diluée avec de la phosphatidyléthanolamine préparée à partir d'E.coli non marqués de façon à obtenir environ I00 000 c/min/µg de phosphore.

Ces trois substrats sont ultrasonnés en présence de tampon tris 0,05 M pH 7,4 pendant I0 min sous 250 Watts dans un Raythéon avec fréquence de I0 kilocycles/secondes.

II - <u>PRELEVEMENT DE SANG ET PREPARATION DE L'EXTRAIT ENZYMATIQUE</u>

Le sang est prélevé sur ACD (acide citrique, citrate de sodium, dextrose) par le Centre Départemental de Transfusion Sanguine. Après la séparation du plasma, les globules rouges sont lavés deux fois par une solution saline à 0,9 p. I00 de NaCl et les leucocytes ainsi que les plaquettes sont écartés.

.../..

(On obtient environ 4 ml de globules rouges pour 10 ml de sang total).

La lyse des globules rouges est effectuée par quatre volumes d'eau distillée pour un volume de globules rouges.

Par centrifugation pendant 20 min à 40 000 xg, le lysat est séparé des stromas correspondants.

Par une même centrifugation mais précédée d'une addition de chlorure de sodium en concentration molaire nous obtenons un lysat que nous appelerons lysat NaCl M, dont 1 ml correspond à 200 l de globules rouges et à 55 mg de protéines. Tous nos résultats sont rapportés à un volume déterminé de globules rouges.

III - TECHNIQUES D'INCUBATION ET MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

1. Conditions d'incubation

Les incubations sont effectuées à 37° dans des tubes à centrifuger soumis à une agitation mécanique pendant 15 min pour le phosphadidylglycérol et la phosphatidyléthanolamine et 30 min pour la phosphatidylcholine. Chaque tube contient le substrat en émulsion (0,5 μg de P pour le phosphatidylglycérol ou la phosphatidyléthanolamine et 1 μg de P pour la phosphatidylcholine), le tampon tris 0,05 M pH 7,4 et les préparations enzymatiques de globules rouges dans un volume final de 2 ml. Les effecteurs employés sont $CaCl_2$ 6,25 x 10^{-4} M et NaCl 0,25 M dans le mileur d'incubation.

L'action enzymatique est arrêtée par addition de 10 ml de mélange chloroforme-méthanol 1/2 (v/v) servant à l'extraction des lipides. Les extraits sont évaporés et les résidus dissous dans un mélange chloroforme-méthanol 1/1 (v/v).

2. Mise en évidence de l'activité enzymatique

La chromatographie en couche mince sur Silicagel G d'après Stahl (28) est effectuée dans le mélange chloroforme-méthanol-eau 65-25-4 (v/v/v) pendant une heure. Elle permet de séparer les phospholipides diacylés de leurs dérivés monoacylés obtenus par hydrolyse enzymatique. Les composés sont localisés par autoradiographie de la plaque. L'acide silicique correspondant à chacun d'eux est prélevé, introduit dans des coupelles et, leur radioactivité est comptée. On en déduit le pourcentage de lysodérivé par rapport au phospholipide initial.

Les résultats sont exprimés en nmoles de produit hydrolysé pour 1 heure d'incubation et pour 1 ml de globules rouges.

3. Trypsine et activateur trypsique

La trypsine employée pour l'activation de la prophospholipase est la trypsine bovine brute, produit Sigma.

L'activateur trypsique est la fraction de colonne résultant de la purification de la trypsine (voir page 20) mais indépendant de la trypsine pure.

R E S U L T A T S

I - MISE EN EVIDENCE D'UNE PROPHOSPHOLIPASE DANS LES GLOBULES ROUGES HUMAINS

A - DIFFERENCES DE COMPORTEMENT AVEC LES GLOBULES ROUGES DE RAT :

Les travaux précédents de Madame PAYSANT ont mis en évidence l'existence d'une phospholipase active dans les globules rouges de rat, capable d'hydrolyser in vitro les phospholipides exogènes diacylés, avec coupure d'acide gras, en phospholipides monoacylés (22 - 23).

Contrairement aux globules rouges de rat, les globules rouges humains ne contiennent pratiquement pas de phospholipase A active (PLA) sur les mêmes substrats phospholipidiques. Par contre l'activité enzymatique est considérablement augmentée sous l'effet de petites quantités de trysine brute (Produit Sigma) ou, comme nous l'avons montré, d'un facteur endogène plaquettaire isolé de sang de rat.

Il existe donc dans les globules rouges humains un précurseur de phospholipase que nous appellerons prophospholipase (PPLA).

1. Action des globules rouges de rat sur les phospholipides exogènes marqués au ^{32}P

Les résultats portés dans le tableau I montrent que le lysat des globules rouges de rat, incubé en absence de trypsine hydrolyse le phosphatidylglycérol (PG) ou la phosphatidyléthanolamine (PE) en lysophosphatidylglycérol (LPG) et lysophosphatidyléthanolamine (LPE) respectivement. Dans les mêmes conditions d'incubation la phosphatidylcholine (PC) n'est pas hydrolysée en lysophosphatidylcholine (LPC). Quand le lysat de globules rouges de rat est additionné de trypsine brute nous observons non seulement une augmentation de LPG et de LPE formés, mais nous révèlons également l'hydrolyse de PC en LPC.

.../..

Les globules rouges de rat possèdent donc deux formes enzymatiques :

- une phospholipase A active, capable d'exercer son activité enzymatique en absence de trypsine dans le milieu d'incubation,
- une prophospholipase A, précurseur inactif d'une phospholipase A devenant active après intervention de la trypsine et capable d'hydrolyser les PG, PE et PC.

2. Action des globules rouges humains sur les phospholipides exogènes marqués au ^{32}P

Les résultats présentés dans le tableau II illustrent clairement :

- l'absence de phospholipase active (PLA) dans les globules rouges humains puisque les taux de lysodérivés obtenus à partir des trois substrats utilisés en absence de trypsine sont particulièrement faibles.
- l'existence d'une prophospholipase A (PPLA) activée par de la trypsine brute dans le milieu d'incubation et capable de dégrader les PG, PE et PC en leurs lysodérivés respectifs.

Les globules rouges humains ne présentent donc qu'une seule forme enzymatique : le précurseur inactif (PPLA) ne pouvant agir sur les substrats employés qu'après action d'un activateur.

L'extrait de trypsine pancréatique brut n'est pas seul activateur de la prophospholipase. En effet, nous avons constaté qu'en ajoutant une préparation d'un lysat de plaquettes isolées de sang de rat à un lysat de globules rouges humains, nous observons la transformation de prophospholipase en phospholipase. Par contre, un lysat de plaquettes humaines n'a apparemment aucun effet activateur sur la prophospholipase.

.../..

Le lysat plaquettaire isolé de sang de rat est aussi capable d'activer la prophospholipase globulaire de rat. A ce sujet, nous avons montré qu'un lysat de globules rouges de rat préparé à partir de sang centrifugé immédiatement après le prélèvement de façon à éliminer les plaquettes, est dépourvu d'activité phospholipasique. Si on préincube ce lysat avec une petite quantité de plaquettes, il retrouve aussitôt une activité phospholipasique.

La phospholipase n'existerait donc dans les globules rouges de rat comme dans les globules rouges humains que sous la forme de prophospholipase, mais pouvant être libérée plus facilement dans les globules rouges de rat lorsque les plaquettes sont présentes ; les plaquettes humaines n'ayant aucune propriété activatrice sur la prophospholipase dans nos conditions expérimentales.

TABLEAU I

Activité phosphalipasique du lysat de globules rouges de rat

Incubations	LPG	LPE	LPC
sans trypsine PLA	5 I20	4 000	0
avec trypsine PPLA	6 400	6 000	I 600

TABLEAU II

Activité phospholipasique du lysat de globules rouges humains

Incubations	LPG	LPE	LPC
sans trypsine PLA	I20	I00	0
avec trypsine PPLA	I4 000	I2 600	I0 000

Les substrats employés sont les ^{32}P phosphatidylglycérol (PG), ^{32}P phosphatidyléthanolamine (PE) et ^{32}P phosphatidylcholine (PC).

Conditions d'incubation : des quantités de PG et PE équivalentes à 0,5 µg de P et de PC correspondant à 1 µg de P sont incubées à 37° avec 20 µl de lysat globulaire (préparé en présence de NaCl M) en milieu tampon tris 0,05 M pH 7,4 en présence de $CaCl_2$ 5,25. $I0^{-4}$ M et NaCl 0,25 M en concentration finale dans un volume de 2 ml.

Pour les incubations en présence de trypsine, le lysat est préincubé pendant I0 min précédant l'incubation, avec de la trypsine brute dans une proportion de I0 p. I 000 par rapport à la teneur en protéines de la préparation enzymatique.

Les résultats sont exprimés en nmoles de lysodérivés formés pour 1 ml de globules rouges et pour une heure d'incubation.

B - CONDITIONS DE L'ACTIVATION

1. Activation par le facteur trypsique

D'après les résultats obtenus en activant la phospholipase par la trypsine brute, nous nous sommes aperçu que c'était une substance contenue dans cette trypsine et non pas la trypsine qui jouait le rôle activateur (voir p. 20). Nous avons donc présenté nos résultats en fonction du facteur activateur isolé.

a) en fonction du temps d'action de l'activateur :

La quantité de lysat incubé, la concentration en activateur et le temps d'incubation avec le substrat restent les mêmes. Seul change le temps de préincubation du lysat avec l'activateur.

Le temps de I5 min correspond à l'incubation du lysat activé avec le substrat aussitôt après avoir ajouté l'activateur trypsique au lysat de globules rouges. Les autres temps sont les temps de préincubations du lysat avec l'activateur allant de 5 à 60 min plus 15 min de temps d'incubation de l'enzyme activée avec le substrat.

Nous constatons dans la figure I une augmentation de l'activité jusqu'à 25 min d'incubation puis un plateau. Nous utilisons donc une préincubation de 10 min suivie d'une incubation de 15 min pour toutes les expériences.

b) En fonction de la concentration en activateur :

La figure II montre un maximum d'activité de la prophospholipase pour une concentration en protéines trypsiques de 10 mg pour 1 000 mg de protéines globulaires puis un palier pour des concentrations plus élevées en activateur trypsique ce qui correspond à un maximum de 15 000 nmoles de LPG formés/ml GR/h.

Figure I

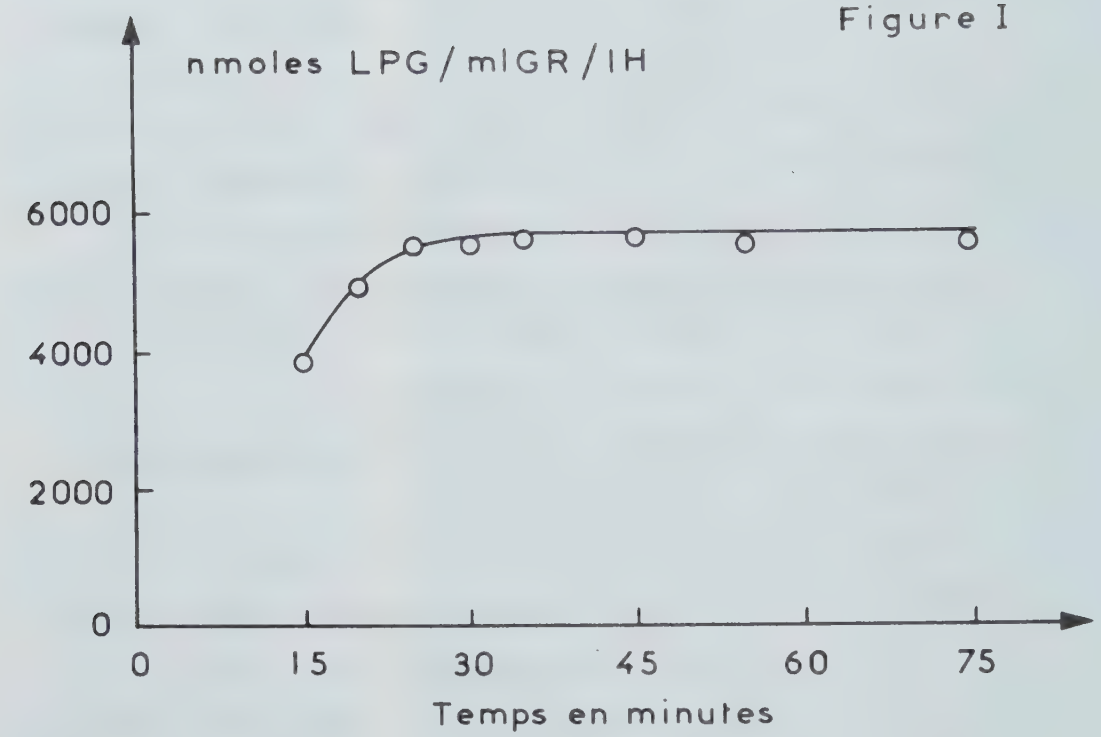


Figure II

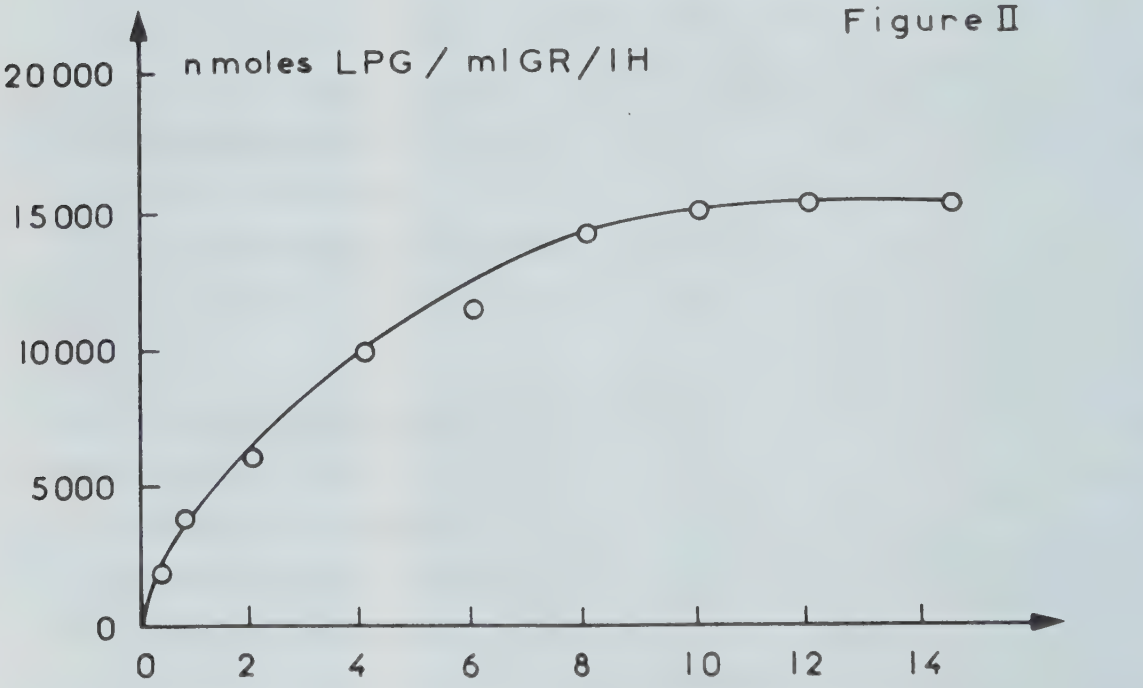


Figure I : activité enzymatique en fonction du temps de préincubation de l'enzyme avec l'activateur trypsique.

Figure II: activité enzymatique en fonction de quantités croissantes d'activateur trypsique.

Milieu d'incubation : Phosphatidylglycérol correspondant à 0,5 µg de P est mis en présence de tampon tris 0,05 M pH 7,4 de $CaCl_2$ $6{,}25 \cdot 10^{-4}$ M, et de NaCl 0,25 M dans un volume final de 2 ml.

Les résultats sont exprimés en nmoles de LPG pour 1 ml de globules rouges et pour une heure d'incubation.

2. Activation par l'extrait plaquettaire isolé de sang de rat

a) En fonction du temps d'action de l'activateur

Le lysat de globules rouges humains est mis en présence d'un lysat de plaquettes isolées de sang de rat pendant 10 min, puis incubé de la même façon que pour l'activateur trypsique.

La quantité de plaquettes est telle, que 1 ml de lysat plaquettaire correspondant à 1 ml de globules rouges de rat, est ajouté à la quantité de lysat globulaire correspondant à 1 ml de globules rouges humains. Ce qui donne : 3 mg de protéines du lysat plaquettaire pour 1 ooo mg de protéines globulaires. Seul change ici le temps de préincubation de cette quantité de plaquettes lysées avec le lysat de globules rouges.

Nous constatons une légère augmentation de l'activité jusqu'à 25 min de préincubation puis l'activité reste constante pour des temps supérieurs (figure III).

b) En fonction de la concentration en activateur

La quantité de lysat plaquettaire utilisée dans le paragraphe précédent étant de 3 mg de protéines plaquettaires pour 1 000 mg de protéines globulaires, nous avons pris des quantités allant du quart au quadruple.

La figure IV montre une augmentation de l'activité enzymatique en fonction de la quantité de lysat plaquettaire ajoutée au lysat de globules rouges, puis un palier à partir de 10 mg de protéines plaquettaires pour 1 000 mg de protéines globulaires ;

.../..

c'est-à-dire un maximum de 17 000 nmoles de LPG/ml GR/h.

Nous avons choisi pour nos expériences ultérieures la quantité de 3 mg de protéines plaquettaires pour 1 000 mg de protéines globulaires de façon à se rapprocher le plus possible des concentrations dans le sang total.

Figure III

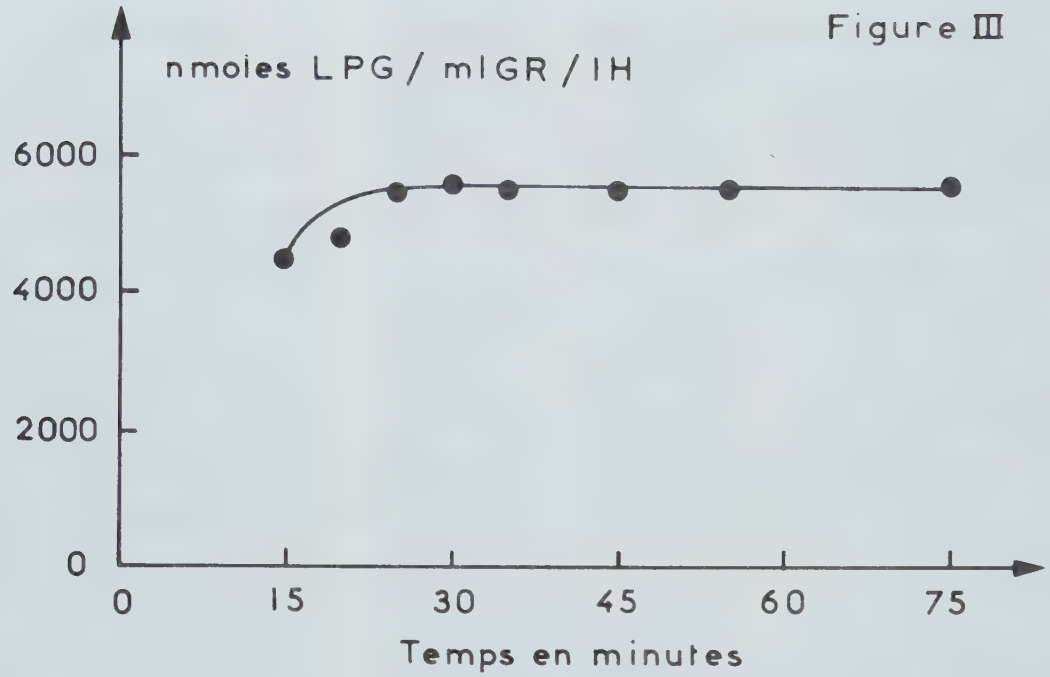


Figure IV

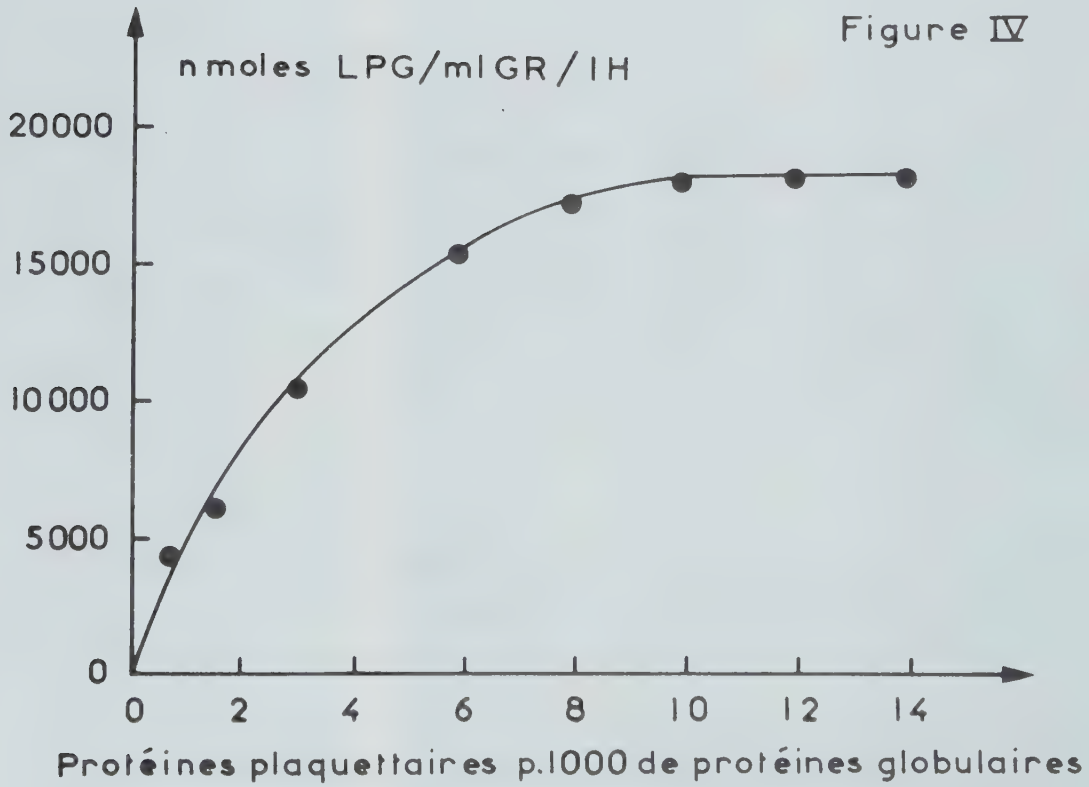


Figure III : Activité enzymatique en fonction du temps d'incubation de l'enzyme avec l'extrait plaquettaire.

Figure IV : Activité enzymatique en fonction de la concentration en extrait plaquettaire.

Milieu d'incubation : phosphatidylglycérol correspondant à 0,5 µg de P est mis en présence de tampon tris 0,05 M pH 7,4 $CaCl_2$ 6,25 . 10^{-4} M et de NaCl 0,25 M dans un volume final de 2 ml.

Les résultats sont exprimés en nmoles de LPG formé pour 1 ml de globules rouges et pour une heure d'incubation.

I. En fonction du temps d'incubation

Nous constatons sur la figure V que la vitesse de réaction est constante jusqu'à 30 % de lysodérivé formé pour le phosphatidylglycérol et 40 % pour la phosphatidylcholine. Au delà de ces concentrations la vitesse de réaction diminue quelles que soient les quantités d'enzyme incubées.

Les temps d'incubations choisis sont donc :

. 15 min pour le phosphatidylglycérol
. 30 min pour la phosphatidylcholine.

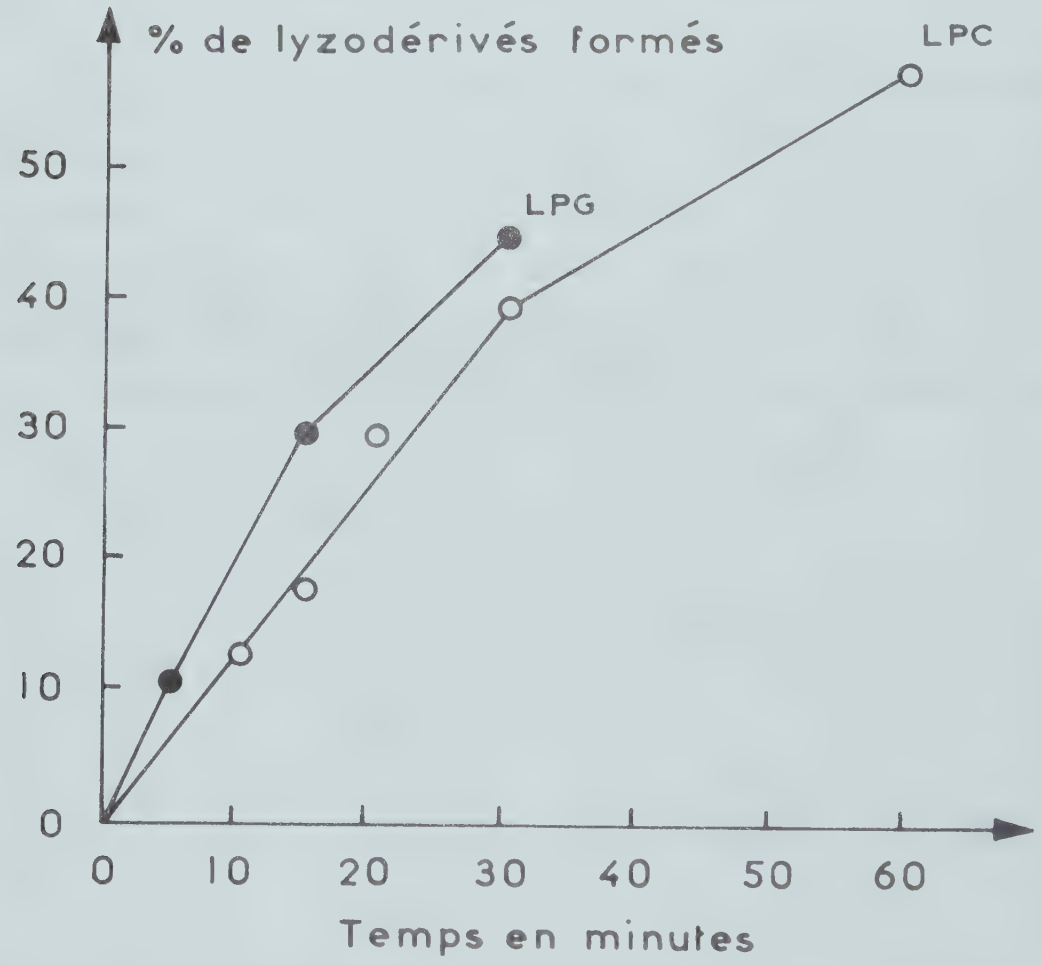


Figure V : Activation de la prophospholipase activée en fonction du temps d'incubation avec le substrat.

Milieu d'incubation : lysat NaCl M correspondant à 1 µl de globules rouges pour le PG (0,5 µg de P) ou 5 µl de globules rouges pour la PC (1 µg de P) est incubé en présence de tampon tris 0,05 M pH 7,4, de $CaCl_2$ 6,25. 10^{-4} M, et de NaCl 0,25 M dans un volume final de 2 ml.

2. En fonction de la concentration enzymatique :

La figure VI permet de constater qu'il existe une relation linéaire entre la concentration d'enzyme et la vitesse initiale de la réaction.

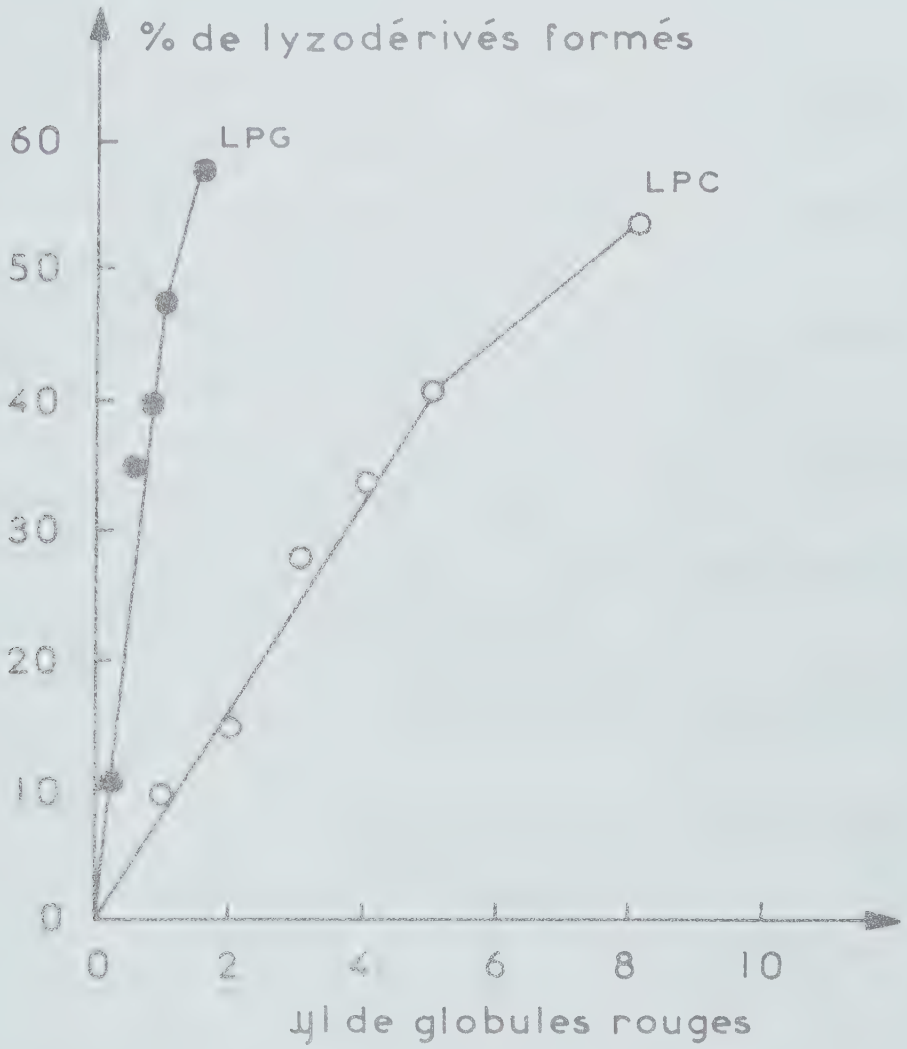


Figure VI : Hydrolyse des substrats en fonction de la concentration en enzyme.

Milieu d'incubation : le PG (0,5 µg de P) ou la PC 1 µg de P) est mis en présence de différentes quantités de globules rouges avec du tampon tris 0,05 M pH 7,4, du $CaCl_2$ 6,25. 10^{-4} M et NaCl 0,25 M dans un volume final de 2 ml.

Les temps d'incubations sont de 15 min avec PG et 30 min avec PC.

3. En fonction du pH du milieu d'incubation

Comme le montre la figure VII, l'activité enzymatique passe par un maximum à pH 7,5.

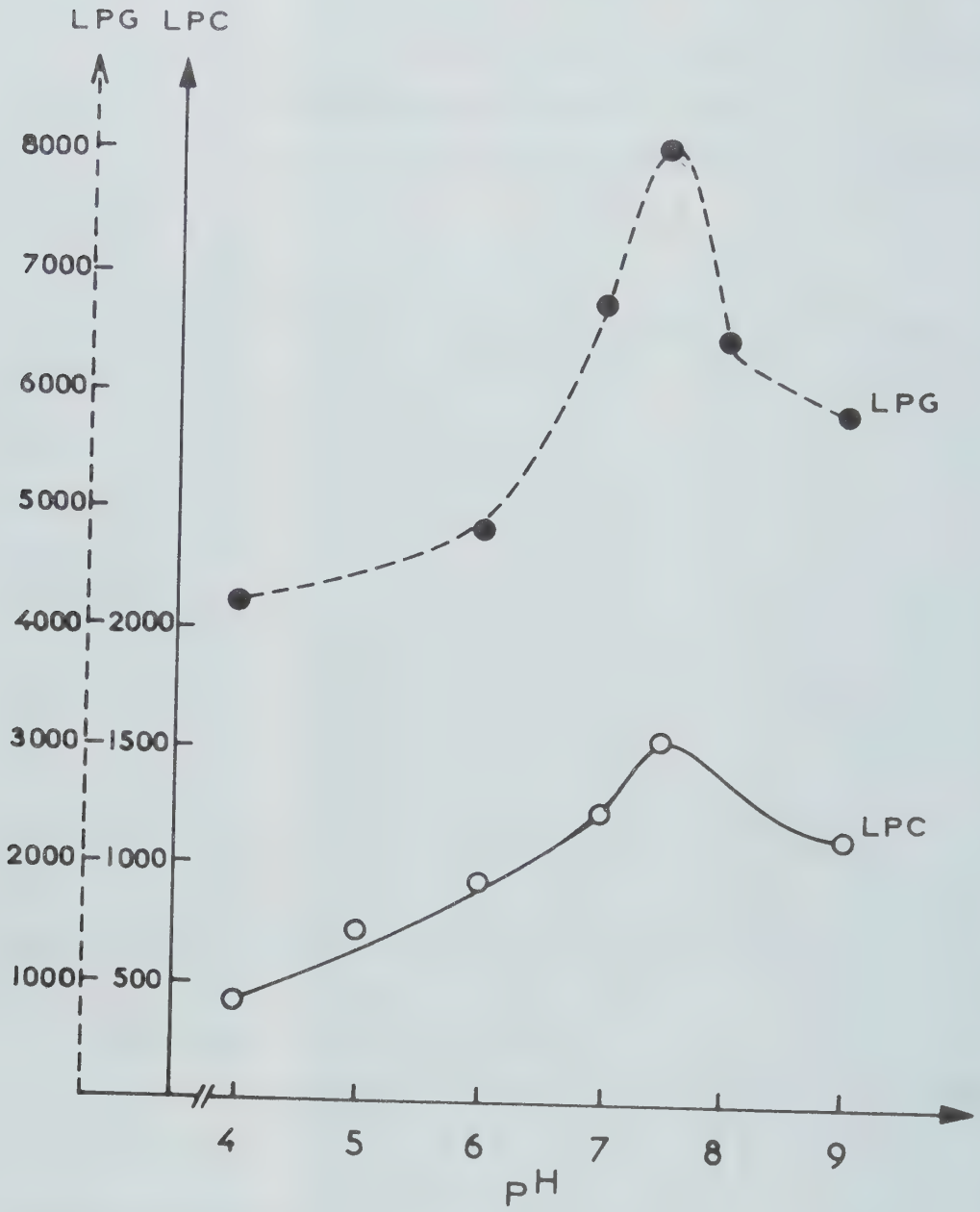


Figure VII : Activité enzymatique en fonction du pH du milieu d'incubation

Milieu d'incubation : les incubations sont faites dans du tampon tris à différents pH les effecteurs sont préparés à partir de ces tampons. Le PG (0,5 µg de P) ou la PC ($1\ \mu g$ de P) est mis en présence de l'enzyme, du $CaCl_2$ 6,25. 10^{-4} M, de NaCl 0,25 M et de tampon tris 0,05 M à différents pH dans un volume final de 2 ml.

Les résultats sont exprimés en nmoles de lysodérivés formés pour 1 ml de globules rouges et pour une heure d'incubation.

4. En fonction de la concentration en substrat

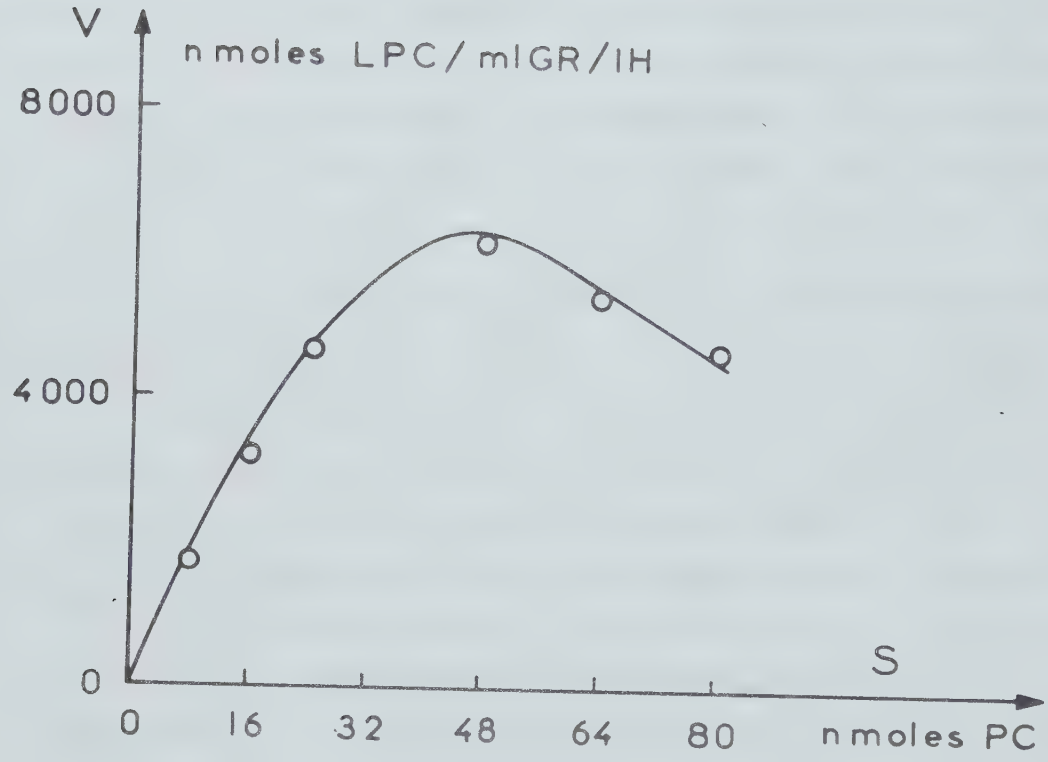
Nous constatons, à la lecture des graphiques (figure VIII) que les courbes obtenues ne tendent pas vers une asymptote horizontale. Elles passent par un sommet et s'inclinent vers la zone correspondant aux concentrations élevées en substrat. Ceci témoigne certainement du fait que la réaction enzymatique est ralentie par un excès de substrat.

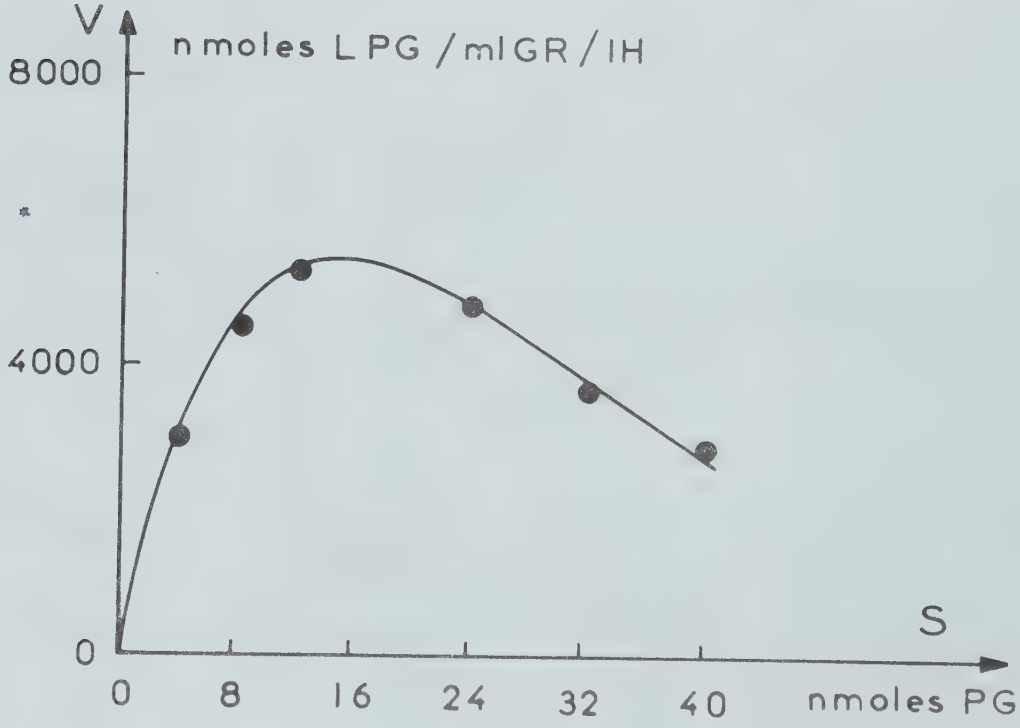
La représentation inverse selon Lineweaver-Burk $\frac{1}{v} = f\ (\frac{1}{s})$ ne donne une droite qu'en présence de concentration faible en substrat (figure IX). Les points correspondant aux fortes quantités de phosphatidylglycérol ou phosphatidylcholine sont systématiquement au-dessus de cette droite.

D'après cette représentation graphique, nous pouvons déterminer la valeur du Km de l'enzyme qui est de :

- $3.IO^{-5}$ Moles de phosphatidylcholine/l
- $0,9.IO^{-5}$ Moles de phosphatidylglycérol/l

Figures VIII



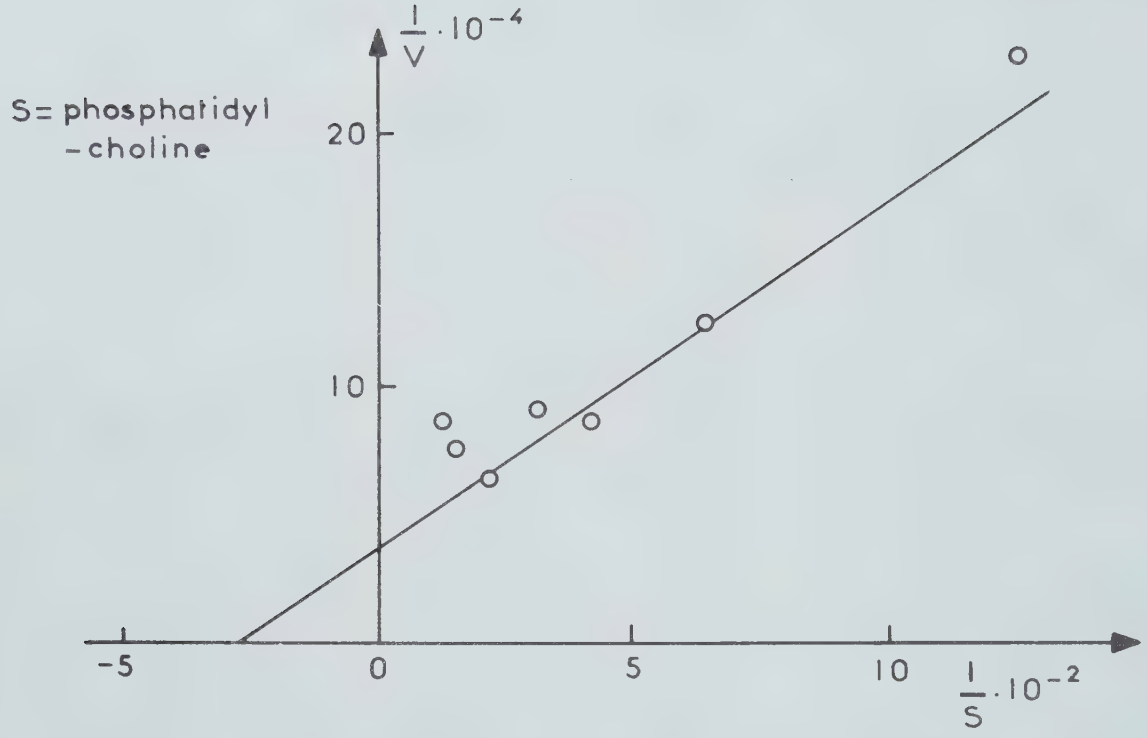


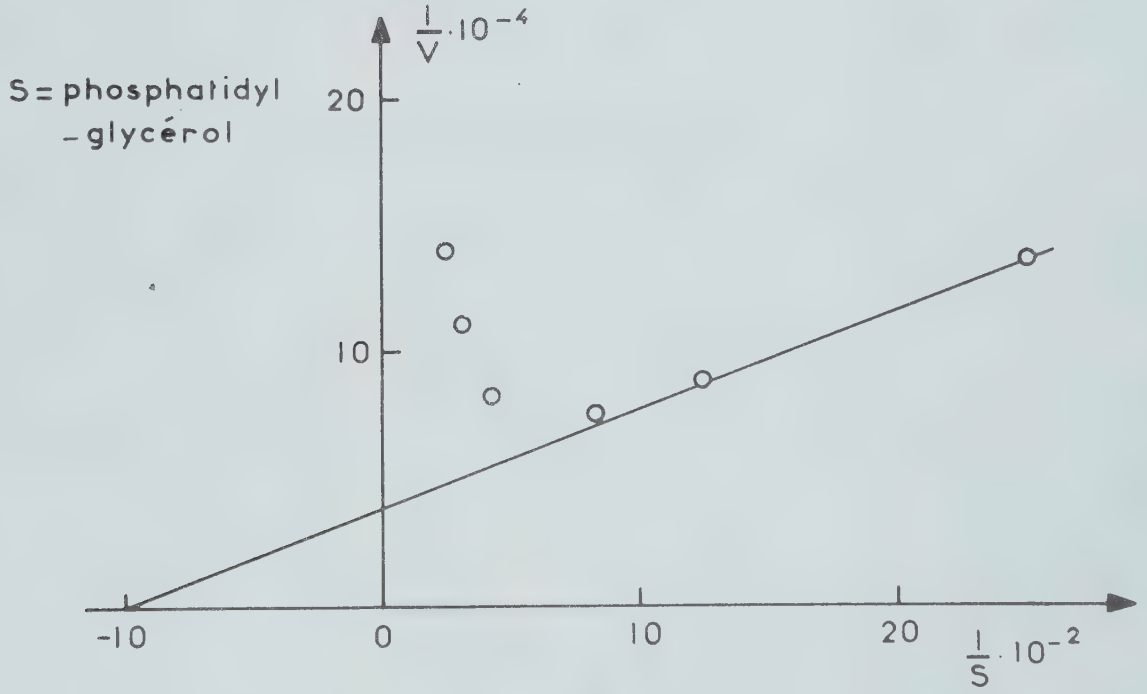
Figures VIII : Variations de la vitesse initiale en fonction de la concentration en substrat

Milieu d'incubation : différentes quantités de phosphatidylcholine ou phosphatidylglycérol sont mises en présence du tampon tris 0,05 M pH 7,4, de $CaCl_2$ 6,25 . 10^{-4} M, de NaCl 0,25 M et d'enzyme dans un volume final de 2 ml.

Les résultats sont exprimés en nmoles de lysodérivés pour 1 ml de globules rouges et pour une heure d'incubation.

Figures IX

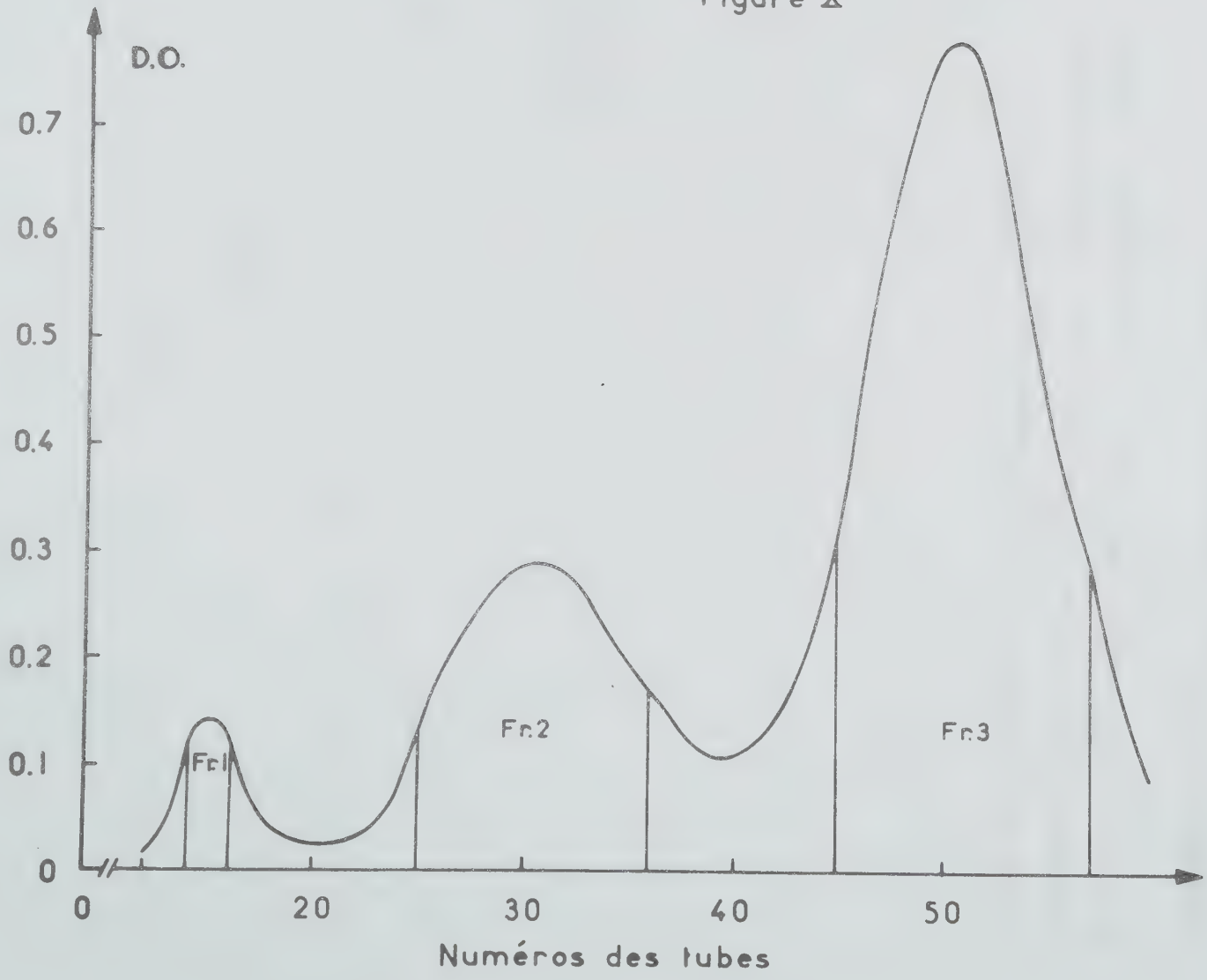

S= phosphatidyl
-choline
1/V .10⁻⁴
20
10
-5
0
5
10
1/S .10⁻²


S= phosphatidyl
-glycérol
1/V .10⁻⁴
20
10
-10
0
10
20
1/S .10⁻²

Figures IX : Représentation de Lineweaver-Burk.

Milieu d'incubation comme dans la légende des figures VIII.
Abscisse : inverse de la concentration M de substrat
Ordonnée : inverse de la vitesse initiale.

Figure X


D.O.
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Fr.1
Fr.2
Fr.3
0
20
30
40
50
Numéros des tubes

III - COMPARAISON DES DEUX ACTIVATEURS LIBERANT LA PROPHOSPHOLIPASE EN PHOSPHOLIPASE

Après avoir vu qu'un extrait de trypsine brute activait la prophospholipase, nous nous sommes aperçus que des plaquettes isolées de sang de rat activaient cette prophospholipase de la même façon.

Nous avons donc voulu étudier chacun de ces activateurs.

A. ACTIVATEUR TRYPSIQUE

La trypsine employée pour la libération de la prophospholipase des globules rouges était un extrait de trypsine brute (produit Sigma). Nous avons donc essayé d'utiliser de la trypsine pure et nous avons choisi la trypsine FLUKA (3 x cryst. puriss.) et la trypsine BOERINGER.

Les résultats obtenus avec ces trypsines étaient nuls.

Le tableau V montre que seule la trypsine brute employée primitivement était capable de transformer la prophospholipase des globules rouges en phospholipase active :

TABLEAU V

TRYPSINES	Activité enzymatique du lysat de globules rouges en nmoles de LPG/mlGR/h	mU TRYPSIQUE /mg
Brute Sigma	5 600	870
Pure Boeringer	I50	4 700
Pure Fluka	25	5 500

Nous pouvions donc penser à l'existence d'un activateur présent dans la trypsine brute, mais indépendant de la trypsine puisqu'elle ne libère plus la phospholipase lorsqu'elle est purifiée.

I. CHROMATOGRAPHIE DE LA TRYPSINE BRUTE SUR GEL DE SEPHADEX

Nous avons utilisé comme gel le Séphadex G. 75.

Le Séphadex G.75 contenu dans du tris 0,05 M est coulé sur une colonne de 50 cm de hauteur possèdant un diamètre de 2 cm.

Nous déposons sur cette colonne 20 mg de trypsine brute dans un volume de tris 0,05 M de 5 ml. Aussitôt après élution du volume mort de la colonne un pic apparaît puis deux autres, les trois pics s'échelonnant du tube 12 au tube 62, les tubes contenant chacun 3 ml (Fig. X).

Les fractions sont réunies en ne prenant que le sommet de chaque pic de façon à ne pas avoir de mélanges, le reste est gardé et les fractions sont dosées.

Différents dosages ont été effectués sur ces trois fractions :

. dosage de protéines (29)
. dosage de trypsine (30)
. contrôle de l'activation sur un lysat de globules rouges humains.

2. DOSAGE DE PROTEINES

Le dosage de protéines est fait selon la méthode de LOWRY (29). Une partie aliquote de chaque fraction est prise pour le dosage et la quantité de protéines est ramenée au volume total de chaque fraction (tableau VI).

3. DOSAGE DE TRYPSINE

Le substrat employé pour le dosage de trypsine est la benzoyl-arginine paranitroaniline (BAPNA).

La trypsine scinde ce substrat pour donner la benzoyl-arginine (BA) d'une part et d'autre part la paranitroaniline (PNA) qui est jaune. La coloration jaune de la PNA est lue par spectrophotométrie à 420 m . L'unité

trypsique est définie comme la quantité d'enzyme hydrolysant 1 mole de substrat par minute (tableau VI).

4. CONTROLE DE L'ACTIVATION SUR UN LYSAT DE GLOBULES ROUGES HUMAINS

Le lysat utilisé est un lysat de globules rouges sur lequel nous faisons agir la trypsine brute puis les différentes fractions après passage sur gel de Séphadex. L'incubation du lysat est effectuée avec une concentration de trypsine de IO ‰ en protéines. Le dosage de protéines de chaque fraction est donc effectué et la même concentration en protéines est utilisée.

Nous en déduisons la quantité de prophospholipase transformée en phospholipase active (tableau VI).

TABLEAU VI

N° des fractions	Protéines en mg	mU trypsique /mg	Incubations	nmoles LPG /mlGR/h
Fr 1	0,460	0	lysat+Fr 1	7 800
Fr 2	4,200	2 700	lysat+Fr 2	-
Fr 3	11,400	68	lysat+Fr 3	-
			lysat+trypsine	8 800

Après ces trois dosages, nous pouvons conclure que la trypsine se trouve dans la fraction 2 mais que cette fraction n'a aucun pouvoir activateur sur la prophospholipase des globules rouges. Par contre, la fraction 1 semble contenir cet activateur puisque 90 % de l'activité enzymatique est retrouvée dans cette fraction.

.../..

Nous avons utilisé le Séphadex G.75 mais aussi le G.IOO et G.200 ; l'activateur semble être une protéine possèdant un poids moléculaire assez élevé puisqu'elle n'est retenue par aucun de ces gels et s'élue donc aussitôt après le volume mort de la colonne.

B. ACTIVATEUR PLAQUETTAIRE

1. PREPARATION DE L'EXTRAIT PLAQUETTAIRE

Le sang est prélevé, après anesthésie de rats par l'éther éthylique dans l'aorte abdominale avec une seringue contenant de l'ACD (Acide citrique-Citrate-Dextrose).

Le sang est versé dans des tubes siliconés et centrifugé 7 min de 200 à 300 xg. Le plasma est prélevé avec les plaquettes et les leucocytes. Ce mélange est alors centrifugé à environ 6 000 xg de façon à éliminer le plasma du culot de plaquettes.

Ce culot de plaquettes est débarrassé des leucocytes et des quelques hématies restantes par 4 à 5 lavages successifs au liquide de PIETTE (2,43 g de chlorhydrate de procaïne et 0,20 g de chlorure de sodium dans 100 ml d'eau). Ce lavage a pour but de lyser les leucocytes et les hématies et de laisser intactes les plaquettes.

Le culot de plaquettes est suspendu dans un volume de sérum physiologique, la lyse de ces plaquettes est faite par congélation et décongélation successives (10 fois environ) puis complétée par traitement aux ultra-sons.

Le lysat de plaquettes est alors centrifugé puis le surnageant prélevé est gardé au congélateur (conservation de 1 à 2 mois à -30°).

2. ACTIVATION DU LYSAT DE GLOBULES ROUGES HUMAINS PAR LE LYSAT PLAQUETTAIRE DE RAT

Cette activation se fait de la même façon que pour l'activateur trypsique. Le lysat de globules rouges est mis en présence du lysat plaquettaire pendant 10 min à 20° puis incubé 15 min à 37° avec le substrat. Les plaquettes isolées d'un volume de sang total de rat sont ajoutées au lysat de globules rouges humains préparé à partir d'un même volume de sang humain.

L'étude cinétique de la prophospholipase activée par les plaquettes a été faite de la même façon que dans le chapitre II. Les courbes obtenues ne variant pas avec l'activateur nous utilisons donc les mêmes conditions d'incubation qu'avec l'activateur trypsique.

3. CHROMATOGRAPHIE DU LYSAT PLAQUETTAIRE SUR GEL DE SEPHADEX

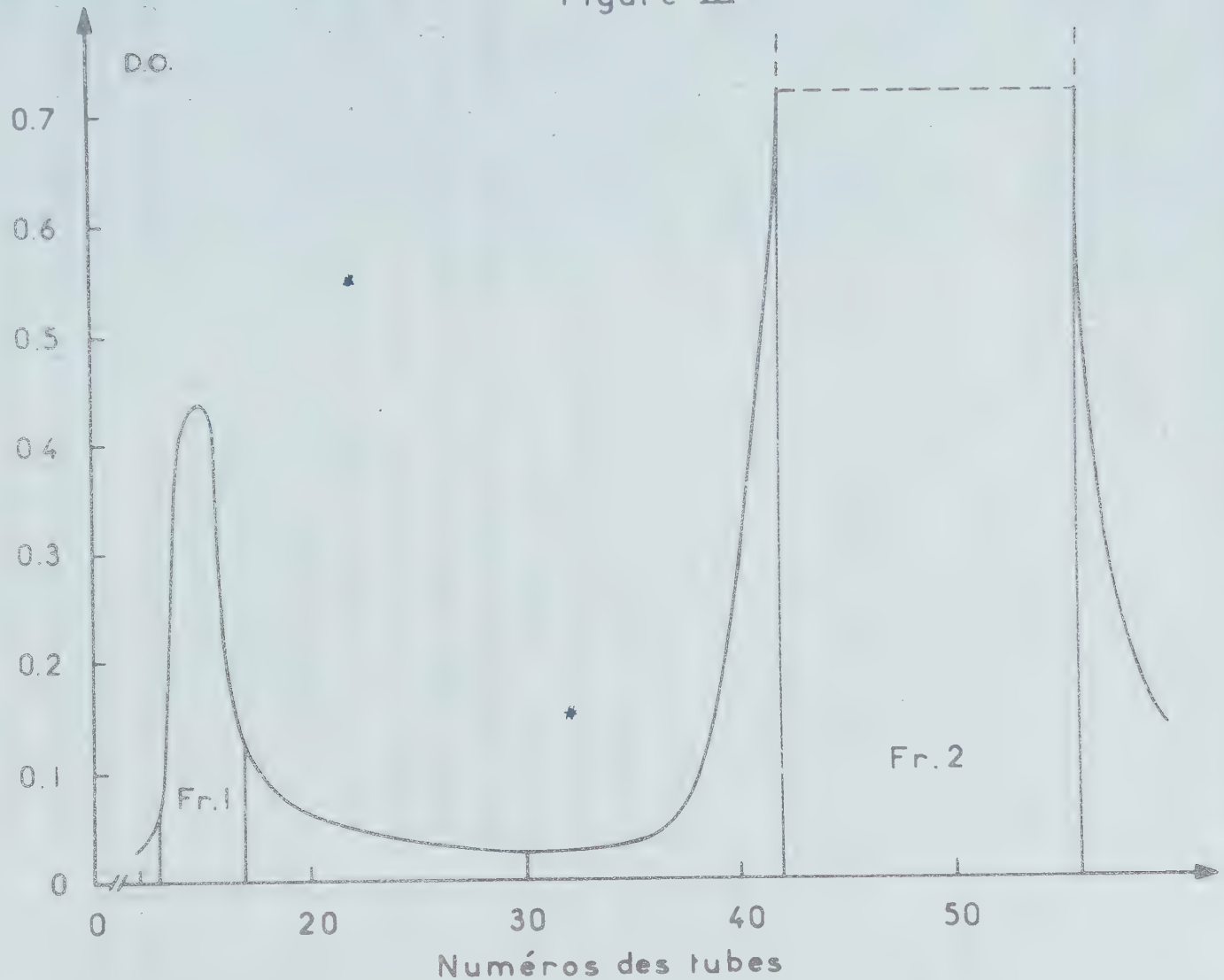
La chromatographie a été faite exactement dans les mêmes conditions que celles utilisées pour la chromatographie de la trypsine brute (colonne de 50 cm de hauteur, 2 cm de diamètre, Séphadex G.75 dans du tampon tris 0,05 M pH 7,4), (fig. XI).

Nous déposons un extrait plaquettaire concentré contenant 20 mg de protéines dans 4 ml.

Nous obtenons deux pics dont un correspondant exactement à la fraction n° 1 de la colonne de trypsine brute c'est-à-dire à l'activateur trypsique.

Le dosage des protéines est effectué selon la méthode de LOWRY (29) et nous trouvons dans la fraction n° 1, 18 % des protéines déposées.

Figure XI



4. CONTROLE DE L'ACTIVATION SUR UN LYSAT DE GLOBULES ROUGES HUMAINS

Nous utilisons un lysat de globules rouges humains que nous activons soit par le lysat plaquettaire initial, soit par les différentes fractions après élution de la colonne de Séphadex.

Lysat + activateur	nmoles LPG /ml GR/h
Lysat + lysat plaquettaire	10 200
Lysat + Fr 1	6 600
Lysat + Fr 2	-

Nous ne récupérons que 60 % de l'activité enzymatique du départ, mais cette perte peut s'expliquer par le fait que le lysat plaquettaire ne se conserve bien qu'à l'état congelé. Son pouvoir activateur sur la prophospholipase du lysat diminue donc pendant l'élution de la colonne.

Dans le cas de la trypsine brute comme dans le cas du lysat plaquettaire, de rat, nous obtenons, après passage sur colonne de gel de Séphadex G.75 (hauteur 50 cm - diamètre 2 cm), une protéine s'éluant entre le tube 13 et le tube 16.

Ces deux protéines activent toutes les deux de la même façon la prophospholipase du lysat de globules rouges humains en phospholipase pouvant agir sur des substrats exogènes.

.../..

A - PREPARATION D'UN LYSAT DE GLOBULES ROUGES HUMAINS

Le sang prélevé sur ACD pour le Centre Départemental de la Transfusion Sanguine est centrifugé à 3 000 t/min pendant 10 min. Après séparation du plasma puis deux lavages des globules rouges avec une solution saline à 0,9 %, un volume mesuré de globules rouges est prélevé. l'hémolyse de ces globules rouges est pratiquée en ajoutant quatre volumes d'eau. Les stromas sont alors séparés du lysat par centrifugation pendant 15 min à 18 000 t/min. Nous avons remarqué que le lysat était plus stable en ajoutant, en même temps que de l'eau, pour hémolyser les globules rouges, du NaCl en concentration molaire dans la solution finale.

En effet un lysat préparé uniquement avec de l'eau précipite au bout de quelques jours et l'activité enzymatique diminue considérablement ; alors que le lysat NaCl M garde sa limpidité et son activité phospholipasique pendant plus de 15 jours. Les stromas ainsi séparés sont remis en suspension soit dans du tampon tris 0,05 M pH 7,4 dans le cas d'un lysat eau, soit dans du tampon tris 0,05 M - NaCl M pH 7,4 dans le cas d'un lysat NaCl M. Les stromas contiennent encore beaucoup d'hémoglobine.

L'activité phospholipasique est mesurée dans le lysat puis dans les stromas (tableau X) sur la phosphatidylcholine et le phosphatidylglycérol en présence de trypsine.

Nous constatons une activité enzymatique plus élevée dans le lysat préparé en présence de NaCl M par rapport à celui préparé seulement avec l'eau. Nous observons dans ce cas une libération plus importante de la prophospholipase. Dans le cas du lysat NaCl M, la concentration de prophospholipase apparaît néanmoins plus grande dans les stromas

.../..

que dans les lysats. On peut donc conclure que la PPLA est plus spécialement attachée aux stromas mais qu'elle en est facilement détachable.

TABLEAU X

Mesure de l'activité phospholipasique dans les lysats et stromas préparés avec de l'eau ou du NaCl M.

nmoles de	Hémolyse par eau		Hémolyse par eau + NaCl M	
	lysat	stromas	lysat	stromas
LPG	I3 440	I4 800	24 400	I9 200
LPC	3 400	3 640	7 500	5 300

LPG = lysophosphatidylglycérol

LPC = lysophosphatidylcholine

Les chiffres sont exprimés en nmoles de LPG ou LPC/mLGR/h.
Conditions d'incubation : voir chapitre III des techniques générales.
Les incubations sont effectuées en présence de trypsine.

B - PREPARATION DES MEMBRANES DEPOURVUES D'HEMOGLOBINE

Cette préparation suit la technique de DODGE et MITCHELL (3I). 80 ml de sang prélevé sur ACD par le Centre Départemental de la Transfusion Sanguine sont centrifugés 20 min à 1 000 xg. Le plasma étant écarté, les globules rouges sont lavés trois fois dans du tampon phosphate isotonique à 310 imOsm (idéal milli osmole) pH 7,4 - 3 ml de suspension de globules rouges lavés sont mis dans 8 tubes à centrifuger contenant chacun 27 ml de tampon phosphate isotonique à pH 7,4. Les tubes sont mis à 4° pendant 30 min ceci pour que le pH soit donné aux cellules avant leur hémolyse, puis centrifugés 20 min à 4 000 xg. Le tampon est décanté et les cellules sont ensuite hémolysées par suspension dans du tampon phosphate hypotonique à 20 imOsm pH 7,4 pour avoir un volume final d'hémolysat de 6 ml. La suspension est mise à centrifuger 40 min à 20 000 xg le surnageant décanté des membranes et quatre autres lavages sont effectués avec ce tampon hypotonique à 20 imOsm. L'activité enzymatique de tous les surnageants est mesurée sur la phosphatidylcholine et le phosphatidylglycérol en présence de trypsine.

Au cours des différents lavages, les surnageants très rouges au départ deviennent de moins en moins colorés et les membranes sont complètement dépourvues d'hémoglobine.

Comme pour le lysat NaCl M dans la première partie du chapitre, nous constatons une diminution de l'activité phospholipasique au fur et à mesure que les surnageants se décolorent. C'est-à-dire que la prophospholipase se détache facilement des stromas comme l'hémoglobine résiduelle.

TABLEAU XI

Mesure de l'activité enzymatique dans les différents surnageants de la préparation des membranes.

	nmoles LPG /ml GR/1h	nmoles LPC /ml GR/1h
Surnageants		
S1 rouge foncé	8 700	I 600
S2 rouge	7 900	I 800
S3 rouge clair	5 300	960
S4 rose	2 300	900
S5 jaune	-	-
Membranes dépourvues d'hémoglobine	720	280

LPG = lysophosphatidylglycérol

LPC = lysophosphatidylcholine

Conditions d'incubation = voir chapitre III des techniques générales

Les incubations sont effectuées en présence de trypsine.

V - TENTATIVE D'ISOLEMENT DE LA PROSPHOSPHOLIPASE

A - PRECIPITATION ETHANOLIQUE ET FILTRATION SUR SEPHADEX

1. MODE OPERATOIRE

- Précipitation éthanolique :

La précipitation éthanolique est faite sur un lysat préparé comme décrit précédemment et stabilisé par du NaCl M. On réalise en premier une précipitation du lysat par de l'éthanol à 75 % ce qui a pour but d'éliminer la plus grande partie de l'hémoglobine. L'alcool est versé goutte à goutte à -20° sous agitation constante. Une fois l'alcool additionné entièrement, un équilibre d'une heure est observé à -20°. On centrifuge à 4 000 xg pendant 10 min à -20°. Un volume témoin du surnageant est prélevé et mis à dialyser contre du tampon tris 0,05 M NaCl M afin d'éliminer l'alcool et de pouvoir tester son activité enzymatique. Le reste du surnageant 75 % est mis à dialyser contre de l'alcool absolu à -20°. L'alcool est changé 4 à 5 fois et la dialyse dure 2 jours. Les sacs sont ensuite vidés de leur contenu qui est mis à centrifuger à 4 000 xg pendant 10min à -20°. Le surnageant est prélevé et le culot de centrifugation est mis en suspension dans du tampon tris 0,05 M NaCl M. Après centrifugation à 0; nous prélevons la fraction soluble dans le tris NaCl M et un lavage du culot est fait. Après une deuxième centrifugation les deux surnageants sont réunis puis dialysés contre du tris 0,05 M NaCl M pH 7,4.

.../..

- Filtration sur Séphadex :

20 g de Séphadex G.75 sont d'abord lavés dans l'eau puis dans du tampon tris 0,05 M NaCl M pH 7,4, dégazés et coulés dans une colonne de chromatographie de 2 cm de diamètre sur 50 cm de hauteur, de façon à ne pas introduire de bulles d'air. On laisse le gel se tasser pendant 24 h en faisant couler sur la colonne du tampon tris 0,05 M NaCl M. La solution à fractionner est déposée à la surface du gel et éluée par du tampon tris NaCl M. C'est ici la fraction soluble dans le tris NaCl M après précipitation à l'éthanol absolu.

Des fractions de 3 ml sont recueillies dans des tubes de collecteur, le spectrophotomètre et l'enregistreur automatique reliés à la colonne donnent la courbe de la concentration en protéines des différents tubes.

2. Résultats

Les chiffres du tableau XII montrent une activité spécifique de 2 800 et un coefficient de purification de I40. Cependant, la perte en protéines est beaucoup trop élevée pour pouvoir continuer la purification et donner les caractéristiques de l'enzyme.

TABLEAU XII

		AS.	CP.
Lysat		20	I
Fraction soluble		I40	7
Fraction Séphadex Hb	(1A	220	II
	(1B	300	I4
	(2A	250	I2
	(2B	3I0	I5
	3	2 800	I40

- l'activité spécifique (AS) est calculée en faisant le rapport de l'activité enzymatique (en nmoles LPG/h) aux protéines (en mg).
- le coefficient de purification (CP) donne le rapport de l'activité spécifique à l'activité spécifique du lysat de départ.

B - RELARGAGE PAR LE SULFATE D'AMMONIUM ET FILTRATION SUR SEPHADEX G.75

1. TECHNIQUE

Le sulfate d'ammonium servant à la précipitation est une solution saturée de sel, amenée à pH neutre par de l'ammoniaque

Le sulfate est introduit peu à peu dans le lysat ou les surnageants, sous agitation magnétique à +4° jusqu'à la concentration de saturation désirée.

L'agitation est maintenue pendant 3 min après l'addition du sel, on laisse s'établir un équilibre de 30 min à +4° ensuite on centrifuge à 30 000 xg pendant 15 min.

Le surnageant est recueilli dans un tube à centrifuger et subit la précipitation suivante.

Les différents précipités sont repris par un volume de tampon tris 0,05 M NaCl M après avoir été broyés dans l'appareil de POTTER pour homogénéiser le milieu.

Le surnageant total est dialysé contre le tampon tris Na Cl M.

2. RESULTATS

Les différents précipités sont incubés avec du phosphatidylglycérol et de la trypsine pour mesurer l'activité enzymatique.

Le tableau XIII montre une activité enzymatique importante dans le précipité à 75 % de saturation de sulfate d'ammonium c'est-à-dire la fraction où précipite l'hémoglobine.

Nous avons donc tenté de séparer la prophospholipase de l'hémoglobine par filtration sur Séphadex G.75.

.../..

Chaque fraction de la colonne de Séphadex est incubée en présence de phosphatidylglycérol et de trypsine de façon à mesurer son activité enzymatique. Nous constatons une activité enzymatique importante dans la fraction II (tableau XIV) correspondant au pic de l'hémoglobine. Nous n'avons donc pas pu séparer par cette méthode la prophospholipase de l'hémoglobine.

Activité enzymatique et dosage des protéines des fractions résultant du relargage au sulfate d'ammonium.

Fractions	Activité enzymatique	% de protéines précipitées
Lysat du départ	8 800	
Précipité 10 % $(NH_4)_2 SO_4$	I60	
" 25 % "	I60	
" 50 % "	I60	
" 75 % "	6 800	9I
Surnageant 75 %	200	

TABLEAU XIV

Activité enzymatique des fractions résultant du passage sur Séphadex G.75

Fractions	Activité enzymatique
Précipité 75 %	6 800
Fraction I	3 200
II	5 600
III	4 800
IV	2 800
V	800
VI	700

Les activités enzymatiques sont exprimées en nmoles de lysophosphatidylglycérol par ml de globules rouges et par heure.

Milieu d'incubation : voir chapitre III des techniques générales

Les incubations sont effectuées en présence de trypsine.

C. PRECIPITATION A pH ACIDE PAR LA CHALEUR

Cette précipitation ne peut s'effectuer que sur un lysat dilué. Un lysat sans dilution étant trop concentré en hémoglobine, cette dernière entraîne la prophospholipase par sa précipitation et le surnageant contient beaucoup moins d'activité enzymatique.

Différentes dilutions ont été effectuées et la dilution du lysat au 1/10eme semble la meilleure :

TABLEAU XV

Activité enzymatique d'un lysat chauffé à différentes concentrations

	nmoles LPG /mlGR/h	Rendement %
Lysat contrôle	28 000	-
St 100° pH 4 lysat ss dilution	2 800	9 %
dilué 1/2	7 200	23 %
dilué 1/5	10 400	34 %
dilué 1/10	22 000	72 %

1. Mode opératoire :

Un lysat NaCl M dilué au 1/10eme dans du tampon tris 0,05 M - NaCl M pH 7,4 est amené à pH 4 avec de l'acide chlorhydrique puis plongé dans un bain-marie bouillant pendant 3 min tout en agitant. Il est aussitôt mis dans la glace pilée puis centrifugé à 40 000 xg pendant 15 min. Le surnageant clair est écarté du culot de protéines dont l'hémoglobine est le constituant majeur.

.../..

2. Résultats

Grâce à la thermostabilité de la prophospholipase nous avons pu réaliser la dénaturation de l'hémoglobine en gardant soluble la plus grande partie de l'activité enzymatique.

Les dosages de protéines ont été effectués de façon à pouvoir calculer l'activité spécifique de cette préparation et son coefficient de purification.

TABLEAU XVI

Purification par dénaturation thermique

	AE	Protéines en mg	AS	CP	Rt
Lysat	28 000	380	70	1	-
St 100° pH4	22 000	2,1	10 000	1 400	72 %

AE = activité enzymatique en nmoles de lysophosphatidylglycérol pour 1 ml de GR pour une heure

AS = rapport de l'activité enzymatique aux protéines en mg

CP = coefficient de purification

Après avoir obtenu un rendement de 72 % et un coefficient de purification de 1 400, nous avons voulu continuer la purification pour étudier l'enzyme. Les globules rouges étant déjà dilués au 1/5eme dans un lysat et le lysat au 1/10eme pour la dénaturation de l'hémoglobine, la dilution est donc très forte (40 g/ml) et il faut concentrer le surnageant.

.../..

Nos tentatives de concentration par ultrafiltration et lyophilisation se sont heurtées à des difficultés car au cours de nos expériences, la prophospholipase a perdu toute son activité.
Nous constatons donc après ces différents essais de purification que cette prophospholipase se sépare difficilement de l'hémoglobine lorsque cette dernière se trouve en forte concentration. Cependant, nous avons réussi à l'en séparer grâce à sa thermostabilité relative.

La meilleure purification pour la prophospholipase semble être celle utilisant la dénaturation thermique de l'hémoglobine puisque pratiquement toute l'hémoglobine est précipitée et il reste 72 % de l'activité enzymatique dans le surnageant.

Nous avons donc voulu essayer cette méthode de purification pour isoler la phospholipase libérée par l'activateur plaquettaire.

1. Mode opératoire

- Dénaturation thermique

Un mélange de globules rouges humains et de plaquettes isolées de sang de rat est lysé par de l'eau et du chlorure de sodium. Après centrifugation et décantation du lysat, ce dernier est dilué au 1/10eme par du tampon tris 0,05 M - NaCl M.

Le lysat dilué est amené à pH 4 avec de l'acide chlorhydrique dilué, puis plongé dans un bain-marie bouillant pendant 3 min tout en agitant.

Il est aussitôt refroidi dans de la glace pilée puis centrifugé à 40 000 xg pendant 15 min. Ce surnageant est écarté du culot de protéines.

- Concentration

Différents modes de concentration de protéines ont été utilisés et le meilleur moyen s'est révélé être la technique d'ultrafiltration en prenant la membrane UM-2 c'est-à-dire, filtrant l'eau, les sels et toutes les substances ayant un poids moléculaire inférieur à 1 000.

.../..

- Electrophorèses sur bande d'acétate de cellulose

Les électrophorèses sont faites dans du tampon Véronal pH 8,6 (formule = Véronal 1,34 g, Véronal sodé 10,30 g pour un litre d'eau) ; la force ionique du tampon étant de 0,05, la migration est faite pendant 1 heure 1/2 sous une tension de 10 volts/cm.

Le colorant employé est l'amidoschwarz (0,5 g dans 50 ml de méthanol + 40 ml d'eau + 10 ml d'acide acétique) et le décolorant un mélange de méthanol 500 ml, acide acétique 100 ml et eau 400 ml.

2. Résultats

Une fois libérée la phospholipase semble beaucoup moins résistante que la prophospholipase puisque elle perd déjà la moitié de son activité après le changement de pH puis encore le moitié par la chaleur.

Par contre après la précipitation par la chaleur, le S^{t} pH 4 100° peut se garder plus d'un mois sans que l'activité ne diminue.

C'est en raison de cette résistance que nous avons utilisé cette technique malgré la perte d'activité.

Le surnageant ne perd pas complètement son activité après concentration par ultrafiltration.

TABLEAU XVII

Purification de la phospholipase libérée

	AE	Protéines en mg	AS	CP	Rt
Lysat activé	25 600	390	66	1	-
S pH 4	10 800	12,5	870	13	42 %
S 100° pH 4	4 800	1,4	3 500	54	19 %

AE = activité enzymatique en unités de lysophosphatidyl-glycérol par ml de globules rouges et par heure.

AS = activité spécifique : rapport de l'activité enzymatique/mg de protéines

CP = coefficient de purification : activité spécifique de la fraction/A.S. du lysat.

Après concentration de 50 ml de surnageant correspondant à environ 1 mg de protéines, nous pouvons faire des électrophorèses sur acétate de cellulose.

L'électrophorèse du surnageant chauffé fait apparaître la présence d'une bande colorée se déplaçant à peine de la ligne de départ dans nos conditions électrophorétiques.

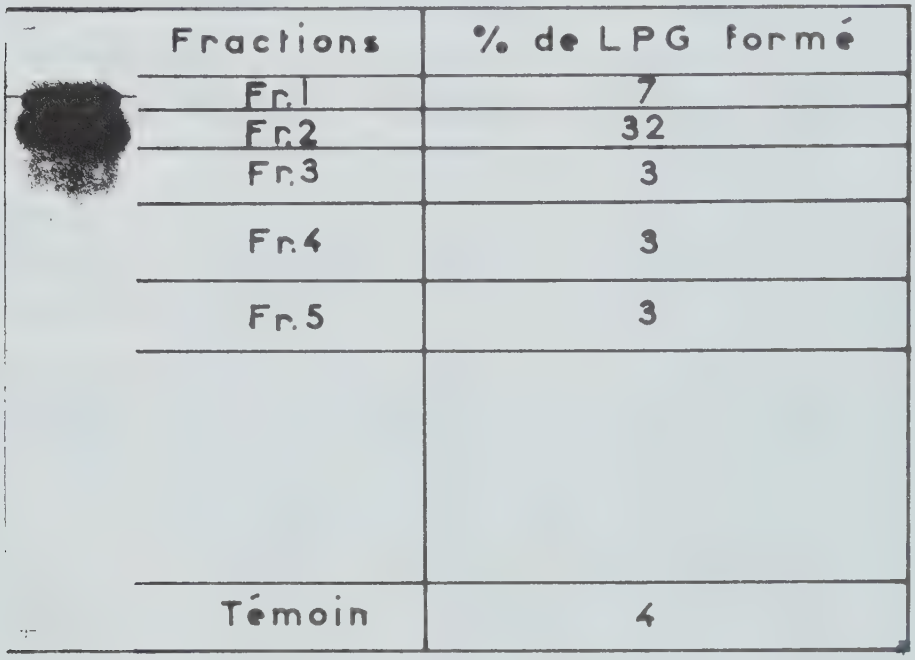
Un essai fait sur gel d'acrylamide donne exactement la même migration c'est-à-dire une bande assez diffuse migrant très près du départ.

Nous avons voulu voir si cette bande colorée correspondait à l' activité enzymatique trouvée dans la fraction.

Pour cela, nous avons déposé et fait migrer simultanément sur deux bandes d'acétate de cellulose la même quantité de surgageant 100° pH 4. Après migration une bande est colorée et l'autre découpée en plusieurs fractions.

.../..

Chaque morceau d'acétate de cellulose est mis directement dans les tubes contenant le milieu d'incubation et incubé 15 min à 37°.
L'activité enzymatique est localisée au niveau de la fraction correspondant à la seule bande colorée de l'électrophorèse. (photo ci-dessous).



Fractions	% de LPG formé
Fr.1	7
Fr.2	32
Fr.3	3
Fr.4	3
Fr.5	3
Témoin	4

Nous avons cherché à purifier cette fraction active en la filtrant sur gel de Séphadex. Le gel de Séphadex utilisé était le Séphadex G-75 et l'élution a été faite par du tris 0,05 M-NaCl M. Cette chromatographie a permis la séparation de l'hémoglobine résiduelle qui passe dans les premiers tubes de la fraction contenant l'activité enzymatique qu'on recueille dans les tubes 34 à 37, les autres fractions n'ayant pratiquement pas d'activité enzymatique. De façon à avoir une approximation du poids moléculaire de l'enzyme, nous avons filtré sur la même

.../..

colonne de Séphadex différentes protéines pures de référence (lysozyme, ribonucléase, cytochrome C, chymotrypsine et sérum albumine) et nous pouvons en déduire de ces expériences que le poids moléculaire de cette phospholipase se situe aux environs de 14 000.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les lysats de globules rouges humains contiennent très peu de phospholipase active, de même que les lysats de globules rouges de rat lorsqu'ils sont dépourvus de plaquettes. Cependant, une activité phospholipasique peut être mise en évidence soit par addition de petites quantités de trypsine brute ou de plaquettes isolées de sang de rat.

Jusqu'à présent une activité phospholipasique libre avait été décelée dans les globules rouges de rat (23 - 24) mais les globules rouges étaient lysés en même temps qu'une partie des plaquettes. Les quantités de phospholipase trouvées variaient suivant la préparation du lysat et en ajoutant de petites quantités de trypsine brute la totalité de l'activité était décelée. Nous nous sommes aperçu en préparant un lysat de globules rouges de rat dépourvus de plaquettes, qu'il n'existait plus d'activité phospholipasique libre dans ces conditions. Cette activité peut être mise en évidence en ajoutant un lysat de plaquettes ou de la trypsine brute.

En travaillant sur les globules rouges humains, nous n'avons pas constaté d'activité phospholipasique libre malgré la présence de plaquettes dans la préparation globulaire. Cependant en ajoutant de petites quantités de trypsine brute ou de lysat plaquettaire de rat, nous décelons une activité phospholipasique.

Le rôle activateur de la trypsine ayant été mis en évidence vis à vis de la phospholipase du venin de serpent (32) et du suc pancréatique (I2), DE HAAS ayant isolé et identifié dans le pancréas de porc la prophospholipase qui devient phospholipase active après intervention de la trypsine pure (FLUKA) (10-11), nous avions pensé comparer nos résultats aux leurs et montrer à nouveau un

tel rôle activateur de la trypsine. Après avoir employé la trypsine brute pour activer la phospholipase des globules rouges humains, nous avons essayé la trypsine pure (FLUKA ou WORTHINGTON 3 fois cristallisée). Ces essais faits sur différentes trypsines pures ou sur de la chymotrypsine n'ont donné aucun résultat, seule la trypsine brute (Produit Sigma) peut activer la prophospholipase des globules rouges humains. Ceci nous a donc conduit à conclure que l'activateur était une substance se trouvant dans les impuretés de la trypsine brute bovine.

Par passage sur colonne de Séphadex d'un extrait de trypsine brute ou d'un lysat plaquettaire de rat, nous obtenons dans les daux cas un premier pic contenant la substance active capable de convertir la prophospholipase en phospholipase active. Dans le cas de l'extrait de trypsine brute, ce pic n'a aucune activité trypsique. Cette substance est donc complètement indépendante de la trypsine. Une étude plus approfondie de ces deux substances est envisagée afin de savoir s'il peut s'agir d'une même substance contenue dans un lysat plaquettaire de rat ou dans un extrait brut de trypsine bovine.

Les globules rouges humains intacts sont dépourvus d'activité phospholipasique. La présence d'un agent hémolysant est donc indispensable pour libérer la prophospholipase. Un lysat préparé avec de l'eau contient moins de prophospholipase qu'un lysat préparé en présence de NaCl M. Le NaCl M altérant beaucoup plus la membrane érythrocytaire, une quantité plus grande de prophospholipase est mise en solution. Lors d'une préparation de membranes dépourvues d'hémoglobine, la totalité de la prophospholipase passe

dans le surnageant. Les membranes dépourvues d'hémoglobine sont ainsi dépourvues de prophospholipase.
Nous pouvons en déduire que la prophospholipase se trouve dans les globules rouges sous une forme soluble mais dans une situation plus ou moins accessible puisqu'elle ne peut être complètement solubilisée qu'après dissociation des globules rouges par des agents provoquant l'altération de la structure lipoprotéinique membranaire. Ces résultats peuvent être comparés avec la libération de la phospholipase A des membranes plasmiques isolées de foie de rat (33).
Une fois solubilisée cette prophospholipase ne peut agir sur les phospholipides exogènes que si elle est activée avec l'extrait de trypsine brute ou le facteur plaquettaire isolé de sang de rat. Elle peut alors hydrolyser les glycérophospholipides dans l'ordre préférentiel suivant le phosphatidylglycérol, la phosphatidyléthanolamine et la phosphatidylcholine : la vitesse de réaction étant trois fois plus grande pour le phosphatidylglycérol que pour la phosphatidylcholine. Parmis les caractéristiques de cette prophospholipase des globules rouges humains, certaines ont des points communs avec les propriétés générales des phospholipases de venin de serpent et des phospholipases tissulaires. Le pH optimum d'action de la prophospholipase activée a été trouvé à pH 7,5. Dans la majorité des travaux réalisés sur différentes phospholipases le pH optimum d'action est autour de la neutralité (4 - 34).
Les phospholipases A_2 sont généralement stables à la chaleur (4). Nous avons constaté la même chose pour la prophospholipase ou la prophospholipase activée des globules rouges humains puisque cette caractéristique a été utilisée avec de bons rendements pour les essais de puri-

fication de l'enzyme.

La présence de NaCl dans le milieu d'incubation augmente considérablement la vitesse initiale. L'activité atteint son maximum pour une concentration de 0,25 M en NaCl.

A cet égard la phospholipase globulaire se comporte de manière à peu près semblable à celle de la lipase pancréatique (35). L'action de la prophospholipase activée est inhibée par un excès de substrat de la même façon que la phospholipase globulaire et plasmatique de rat et rappelle le cas de l'inhibition par les glycérides de la lipase pancréatique (35).

Les essais d'isolement de la prophospholipase n'ont abouti qu'à une purification limitée en raison des difficultés rencontrées pour concentrer la protéine sans perte d'activité enzymatique. Nous avons au contraire obtenu une relativement bonne purification de la phospholipase libérée par un des facteurs activateurs présent dans les plaquettes isolées de sang de rat. Après purification de la phospholipase nous avons réussi à concentrer une assez grande quantité de surnageant de façon à la filtrer sur gel de Séphadex. La filtration sur Séphadex nous a permis de donner un ordre de grandeur du poids moléculaire de l'enzyme qui serait aux alentours de 14 000.

Lors de la tentative d'isolement de la prophospholipase, nous avions pu obtenir aussi un ordre de grandeur de son poids moléculaire puisqu'elle est éluée du Séphadex aussitôt après l'hémoglobine.

Nous pouvons donc penser à un poids moléculaire compris entre 60 000 et 50 000. Pour que cette prophospholipase soit transformée en phospholipase, il faut l'intervention d'un activateur qui libère une protéine active ayant un poids moléculaire de 14 000 donc beaucoup plus faible.

.../..

L'activateur se comportant comme une macromolécule on ne peut pas imaginer que l'activateur ou une partie de sa molécule se fixe sur la prophospholipase puisqu'il y aurait augmentation du poids moléculaire de la forme active. Au contraire, la forme active a un poids moléculaire plus faible qui fait penser à une rupture de la molécule prophospholipasique.

On peut envisager soit une rupture physique, soit une rupture enzymatique de la prophospholipase. Les résultats trouvés lorsque nous avons fait agir des quantités croissantes d'activateur à la prophospholipase et où l'activité obtenue dépendait plus de ces quantités que de la durée des incubations ne sont pas en faveur de l'hypothèse d'une rupture enzymatique.

Dans l'état actuel des recherches l'hypothèse la plus vraisemblable serait donc que le facteur activateur agisse en détachant la phospholipase active de son précurseur de poids moléculaire plus élevé.

RESUME

Une activité phospholipasique A_2 est mise en évidence dans les globules rouges humains. Cette activité ne peut être décelable qu'après action de petites quantités de trypsine brute ou d'un facteur endogène plaquettaire isolé de sang de rat.

Les globules rouges humains ne contiennent donc qu'une forme enzymatique inactive appelée prophospholipase qui devient active après intervention d'un de ces facteurs.

L'activité maximum obtenue est de 15 000 à 20 000 nmoles de lysophosphatidylglycérol libéré en une heure pour 1 ml de globules rouges.

Il existe une relation linéaire entre la concentration enzymatique et la vitesse initiale de la réaction. Le pH optimum d'action de cette phospholipase est pH 7,5.

La réaction enzymatique est ralentie par un excès de substrat et la valeur du Km de l'enzyme est de 0,9. 10^{-5} Moles de PG/l et de 3.10^{-5} Moles de PC/l.

L'essai de purification de la trypsine brute montre que l'activateur est indépendant de la trypsine et qu'il se comporte comme une macromolécule. Celui du facteur plaquettaire conduit aussi à une molécule de poids moléculaire supérieur à 200 000.

Après préparation d'un lysat de globules rouges et de membranes dépourvues d'hémoglobine nous pouvons conclure que la prophospholipase se trouve sous forme soluble dans les globules rouges mais que sa solubilisation n'est complète qu'après dissociation de la structure membranaire.

Des tentatives d'isolement de la prophospholipase ont été faites. On peut déduire des résultats de la chromatographie par filtration sur Séphadex que son poids molécu-

.../..

laire est situé aux environs de 60 000.
La thermostabilité de la prophospholipase est très grande elle résiste plus de 3 min à 100° C.
Les essais de purification de la phospholipase libérée par l'activateur ont permis d'aboutir à une préparation enzymatique active. Elle est moins thermostable : elle perd 60 % d'activité par chauffage à 100° C pendant 2 min.
Evalué par chromatographie sur Séphadex, son poids moléculaire est aux alentours de 14 000.

LONG C. and PENNY I.F. (1957) Biochem. J. 65, 382
The structure of the naturally occuring phosphoglycerides.

DE HAAS and VAN DEENEN (1961) Rev. Trav. Chim. Pays-Bas 80, 951.
Synthesis of enantiomeric mixed-acid phosphatides

GATT S., BARCUHOLZ Y. and ROITMAN A. (1966) Biochem. Biophys. Res. Comm. 24 n° 2 169.
Isolation of rat brain lécithinase A specific for the $_1$ position of lecithin.

RIMON A. and SHAPIRO B. (1959) Biochem. J. 71 620.
Properties and specificity of pancreatic phospholipase A.

VOGEL W. C. and ZIEVE L. (1960) J. Clin Invest. 39 1295.

MAGEE W.L., GALLAI-HATCHARD J., SANDERS H. and THOMPSON R.H.S. (1962) Biochem. J. 83 17.
The purification and properties of phospholipase A from human pancreas

EPSTEIN B. and SHAPIRO B. (1959) Biochem. J. 71 615.
Lecithinase and lysolecithinase of intestinal mucosa.

EISENBERG S., STEIN Y. and STEIN O. (1968) Biochim. Biophys. Acta 164 205.
Phospholipases in arterial tissue.

WEBSTER G.R. and COOPER M. (1968) J. Neurochem. 15 795.
On the site of phosphatide acyl hydrolase activity of rat brain homogenates on lecithin.

DE HAAS G.H., POSTEMA N.M., NIEUWENHUIZEN W. and VAN DEENEN L.L.M. 1968 (a) Biochim. Biophys. Acta 159 103.
Purification and properties of phospholipase A from porcine pancress.

DE HAAS G.G., POSTEMA N.M., NIEUWENHUIZEN W. and VAN DEENEN L.L.M. 1968 (b) Biochim. Biophys. Acta 159 118.
Purification and properties of an anionic zymogen of phospholipase A from porcine pancreas.

BELLEVILLE J. et CLEMENT J. (1968) Bull. Soc. Chim. Biol. 50 n° 9 1419.
Activation par la trypsine de la phospholipase A_2 du suc pancréatique d'homme et de rat.

SAITO K. et HANAHAN D. (1962) Biochemistry 1 n° 3 521.
A study of the purification and properties of the PA of Crotalus Adamenteus venom.

.../...

14. JAMES.SALACH I., TURINI P., SENG R., HAMBER J. and SINGER T.P. (1971) J. Biol. Chem. 246 n° 2 [illegible].
Phospholipase A of snake venoms. Isolation and molecular properties of isoenzymes from Naja Naja and Vipera Russelii venoms.

I6. KAWAUCHI S., IWANAGA S., SAMEJIMA Y and SUSUMI T. (1971) Biochim. Biophys. Acta 236 142
Isolation and characterization of two phospholipase A's from the venom of Agkistrodon Halyo Blomhoffii.

I6. WAITE M. and SISSON P. (1971) Biochimistry 10 n° 12 2377.
Partial purification and characterization of the phospholipase A_2 from rat liver mitochondria.

I7. DE HAAS G. H., SLOTBOOM AJ., BONSEN P.P.M. and VAN DEENEN L.L.M. MAROUX S., PUIGVERGER A. and DESNUELLE P. (1970) Biochim. Biophys. Acta 221 3I.
Studies on phospholipase A and its zymogen from porcine pancreas I. The complete amino-acid sequence.

I8. DE HAAS G. H., SLOTBOOM AJ., BONSEN P.P.M. and VAN DEENEN L.L.M. MAROUX S., PUIGVERGER A. and DESNUELLE P. (1970) Biochim. Biophys. Acta 221 54.
Studies on phospholipase A and tis zymogen from porcine pancreas. II. The assigement of the position of six disulfures bridges.

I9. PROULX P.R. and VAN DEENEN L.L.M. (1967) Biochim. Biophys. Acta 144 17[illegible]
Phospholipase activities of Escherichia coli.

20. PROULX P.R. and VAN DEENEN L.L.M. (1966) Biochim. Biophys. Acta 125 59[illegible]
Acylation of lysophosphoglycerides in Escherichia coli.

2I. FUNG C.K. and PROULX P.R. (1968) Canadian J. of Biochem. 47 371.
Metabolism of phosphoglycerides in Escherichia coli. The presence of phospholipase A.

22. DELBAUFFE D., PAYSANT M., et POLONOVSKI J. (1968) C.R. Acad. Sc. Paris 266 1186.
Essais de purification de la phospholipase A des globules rouges de ra[illegible]

23. DELBAUFFE D., PAYSANT M., et POLONOVSKI J. (1968) Bull. Soc. Chim. Bio[illegible] 50 n°9 1431.
Phosphatidylglycérolphospholipase A. I. Influence des effecteurs.

.../..

24. BITRAN M., WALD R., PAYSANT M., et POLONOVSKI J. (1971) C.R. Soc. Biol. 165 1847.
Activité phospholipasique A des globules rouges de rat. Libération de phospholipase au cours de l'hémolyse.

25. FOLCH-PI J., LESS M., et SLOANE G.H. (1957) J. Biol. Chem. 226 497.
A simple methode for the isolation and purification of total lipids from animal tissues.

26. PAYSANT M., SOLER C., WALD R. et POLONOVSKI J. (1966) Bull. Soc. Chem. Biol. 48 863.
Activité enzymatique de la rate de rat sur le phosphatidylglycérol.

27. DELSAL Y.L. et MANHOURI H. (1955) Bull. Soc. Chem. Biol. 37 1041.
Etude comparative des dosages colorimétriques du phosphore. Recherche d'une méthode de haute sensibilité applicable au dosage du phosphore organique dans les spots après chromatographie.

28. STAHL E. (1958) Chem. Zeitung 82 323.

29. LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., LEWIS FARR A. and RANDALL R. J. (1951) J. Biol. Chem. 193 265.
Protein mesurement with Folin phenol reagent.

30. BIETH J., METAIS P., et WARTER J. (1966) Ann. Biol. Clin. 7-9 786
Dosage de la trypsine par la benzoylarginine-P-nitroanilide et ses applications.

31. DODGE J.T., MITCHELL C. and HANAHAN J.D. (1963) Arch. Biochem. Biophys. 100 119.
The preparation and chemical characteristics of hemoglobin free ghosts of human erythrocytes.

32. MARINETTI V., (1965) Biochim. Biophys. Acta. 98 n°3 554.
The action of phospholipase A on Lipoproteins.

33. TORQUEBIAU-COLARD O., PAYSANT M., WALD R. et POLONOVSKI J. (1970).
Bull. Soc. Chim. Biol. 52 n°10 1061.
Phospholipase A de membranes plasmiques isolées de foie de rat. Action sur les phospholipides exogènes.

34. HANAHAN D.J., RODBELLA M. et TURNER L.D. (1954) J. Biol. Chem. 206 431.
Enzymatic formation of monopalmitoleyl and monopalmitoyllecithin.

35. BENZONANA. Thèse de Doctorat és Sciences Marseille. 1967.
Contribution à l'étude du mode d'action de la lipase pancréatique en milieu hétérogène.